N° d'ordre 95 ISAL0042 Année 1995

THESE

présentée devant

l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

pour obtenir

le grade de Docteur

Formation Doctorale : Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques

par

SAUVION Nicolas

DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques

Effets et modes d'action de deux lectines à mannose sur le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum* (Harris).

Potentiel d'utilisation des lectines végétales dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons.

Soutenue le 20 juin 1995 devant la commission d'examen :

NARDON Paul	Prof. INSA de Lyon	Directeur thèse
LEGAY Jean-Marie	Prof. UCB Lyon 1	Président
GATEHOUSE Angharad	Res. Fellow - Univ. Durham (GB)	Rapporteur
BOURNOVILLE René	DR INRA	Rapporteur
ROUGE Pierre	Prof. UPS Toulouse	Rapporteur
RAHBE Yvan	CR INRA	
RIBA Guy	DR INRA	

Résumé

Nous avons recherché des protéines toxiques pour les pucerons (Homoptères, insectes piqueurs-suceurs phloémophages) et étudié le mode d'action de certaines d'entre elles. Ce travail constitue une première étape d'un programme de création de plantes résistantes aux pucerons par génie génétique.

Les caractéristiques toxicologiques de nombreuses protéines sont évaluées par des tests d'ingestion sur milieux artificiels définis. Des lectines d'origine végétale se liant au mannose présentent des propriétés toxiques intéressantes. Notre étude porte sur la Concanavaline A (lectine de *Canavalia ensiformis* [L.] DC, ConA) qui est une lectine modèle très étudiée du point de vue biochimique, et la lectine du perce-neige (*Galanthus nivalis* L., GNA) dont les caractéristiques en font un bon candidat à l'application envisagée.

Nous mettons en évidence une variabilité de la toxicité des lectines à mannose chez six espèces de pucerons. La ConA est moins active sur les espèces polyphages. Elle n'est pas phagorépulsive pour notre puceron modèle, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) et agit en quelques heures aux doses moyennes, notamment en inhibant l'ingestion. Une adaptation comportementale à moyen terme (24 h-48 h) est également mise en évidence. Des techniques de marquage révèlent que la cible physiologique primaire de la ConA est la portion antérieure du mésentéron. Elle s'y fixe en très grande quantité. Après liaison aux cellules épithéliales, la lectine induit une hypertrophie de ces cellules et un détachement de leur membrane apicale. Des expériences de compétition lectines/mannosides indiquent que la liaison toxine-épithélium ne semble pas dépendre uniquement d'une interaction sucre-lectine. Nous observons également une forte perturbation du métabolisme des acides aminés des pucerons. Le mode d'action de la ConA et de la GNA diffèrent sensiblement sur ce point.

Les premiers tests biologiques effectués sur des pommes de terre transgéniques exprimant de manière constitutive le gène de la GNA sont variables mais prometteurs.

Abstract

The aim of this study is to identify proteins that are deleterious to aphids (Homoptera; Aphididae), and to determine the mechanisms of action of some of them. This work is a first step in a defence strategy against aphids based upon the use of transgenic plants expressing such toxic plant proteins.

Amongst the molecules tested, two mannose-binding lectins, ConA and GNA, from jackbean (*Canavalia ensiformis*) and snowdrop (*Galanthus nivalis*) respectively, induced significant mortality and growth inhibitory effects on aphid nymphal development; these were thus chosen for subsequent investigations.

Dose-response curves of mannose binding lectins were shown to differ substantially between the six aphid species tested. At sub-lethal doses GNA and ConA adversely affected total fecundity and the dynamics of reproduction of both pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris), and peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer. ConA acted as an antifeedant, but not as a feeding deterrent. On the model aphid *A. pisum*, high levels of ConA significantly altered ingestion rates, but at moderate levels, insects appeared to exhibit a time-dependent tolerance of the antifeedant. The stomach and anterior part of the midgut were shown to be the primary physiological targets of ConA. As a result of its binding to epithelial cells, the lectin was shown to induce hypertrophic growth of these cells and subsequent shedding of the membrane surface. Competitive experiments with different mannosides suggested that this interaction appeared not to be simply a consequence of binding of the lectin to mannose residues. Both ConA and GNA caused distinct disturbances in the steady-state levels of free amino acids in the aphid, but the effects of the two lectins differed significantly from each other.

Effects of lectins are discussed in relation to the use of transgenic plants expressing such toxic proteins for potential control of aphid populations.

Avant-propos

Mes premiers remerciements s'adresseront au Professeur Paul Nardon, directeur du laboratoire de Biologie Appliquée (INRA-INSA) de Lyon, qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je tiens à souligner les efforts qu'il met en oeuvre pour assurer aux étudiants un soutien scientifique et matériel leur permettant de se former à la recherche et de réaliser leur travail dans de bonnes conditions.

Je remercie le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur pour la bourse qu'il m'a octroyée. Sans cette aide, je n'aurais pu conduire ce travail de thèse et il est fort probable que mes espoirs de faire carrière dans la recherche auraient été remis en cause.

Toute ma reconnaissance va à l'"équipe puceron" du laboratoire : Yvan Rahbé, Gérard Febvay et Guy Bonnot. Non seulement ils m'ont fait bénéficier de la complémentarité de leur compétences, mais surtout ils ont su me transmettre toute leur rigueur scientifique. Yvan m'a encadré tout au long des années du DEA et de la thèse avec le dynamisme et l'enthousiasme qui le caractérise. J'ai beaucoup apprécié ses qualités tant scientifiques qu'humaines. Gérard et Guy m'ont apporté principalement leur aide dans les analyses statistiques des données et dans les étapes de rédaction d'articles ou de la thèse.

Une partie de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Durham (GB). Je remercie John Gatehouse de m'y avoir accueilli. Je suis très reconnaissant à Angharad Gatehouse pour la qualité de son encadrement et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Je suis très honoré qu'elle ait accepté de le juger en tant que rapporteur.

Je remercie vivement Monsieur René Bournoville, directeur du laboratoire de Zoologie de l'INRA de Lusignan (86). Il a guidé mes premiers pas dans le domaine de la recherche et m'a vivement encouragé à la fin de mon année de Maîtrise à poursuivre mes études pour effectuer une thèse. C'est avec beaucoup de plaisir que je l'ai vu accepter d'être rapporteur.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Pierre Rougé, directeur du laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentale au CNRS de Toulouse, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur, alors même que le monde complexe des pucerons lui était peu connu.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Jean-Marie Legay, ex-Directeur de la Formation Doctorale, pour les conseils qu'il m'a prodigués et pour avoir accepté d'être membre du jury.

Merci également à Monsieur Guy Riba, directeur du département de Zoologie de l'INRA pour sa présence en tant que membre du jury.

J'ai vraiment beaucoup de plaisir à associer à ce travail tous les membres du laboratoire chercheurs ou techniciens. Je voudrais en particulier remercier Christiane, la partie consacrée à l'histologie n'aurait pas été réalisable sans son aide, et Josette qui a effectué les dosages d'acides aminés libres. Je ne voudrais pas non plus oublier Gabrielle pour son aide (préparations des solutions de milieu, tests de toxicité, etc) et Alain (plantations), ni Bernard, Simon et Hubert pour leurs conseils pertinents et avisés, ni bien-sûr Annie pour ses talents de relectrice !

Je tiens également à remercier chaleureusement le personnel du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie et à la Géologie de l'Université Claude Bernard. Leur patience et leur persévérance ont permis de surmonter les nombreuses difficultés rencontrées pour l'observation de l'ultrastructure de l'intestin des pucerons.

J'ai été aidé dans la frappe de ce manuscript par Christelle. Je la remercie d'avoir sacrifié certains de ses samedis et de ses dimanches pour qu'il soit rédigé dans les temps...

Et puis, je m'en voudrais de ne pas associer mes parents à ce travail. Merci Denis, Bérengère, Frédérique, Anne et Papy pour vos encouragements. Mention spéciale quand même à Guillaume pour ses superbes dessins.

Ce travail te doit aussi beaucoup Joël et pas seulement pour les quelques heures de relecture que je t'ai imposée...

Enfin, Anne, je ne saurais trop louer ta patience et te remercier pour le soutien que tu m'as toujours apporté, en particulier pendant ces derniers mois...

Liste des abréviations

ACA :	lectine de l'amaranthe, *Amaranthus caudatus* L.
ACP :	Analyses en Composantes Principales
ADN :	acide désoxyribonucléique
AFC :	Analyse Factorielle des Correspondances
ARN :	acide ribonucléique
ASA :	lectine de l'ail, *Allium sativum* L.
BCH :	chitinase du haricot
BDA :	lectine de la bryone dioïque, *Bryonia dioica* Jacq.
BPA :	lectine de *Bauhinia purpurea* L.
BSII :	lectine de *Griffonia simplicifolia* (Welw.) Baill
ConA :	lectine de la canavalia, *Canavalia ensiformis* [L.] DC
CPA :	lectine du pois-chiche, *Cicer arietinum* L.
CpTI :	serpine inhibiteur de protéase du niébé, *Vigna unguiculata* Walp
CSA :	lectine du genêt-à-balais, *Cytisus scoparius* Link.
DDT :	dichloro-diphényl trichloroéthane (insecticide)
DIMBOA :	2.4-dihydroxy-7-, méthoxy-1.4-benzoxine-3-one = acide hydroxamique
DSA :	lectine de la *Datura stramonium* L.
ECA :	lectine du flamboyant, *Erythrina cristagalli* L.
ECL :	Enhanced ChimioLuminescence
EHL :	lectine d'*Eranthis hyemalis* [L.]Salisb.
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FAO :	Food and Agriculture Organisation
GalNAc :	N-acétyl-galactosamine
GlcNAc :	N-acétyl-glucosamine
GNA :	lectine du perce-neige, *Galanthus nivalis* L.
GNA2 :	construction simple de plasmide avec le gène de la GNA
GSAII :	= BSII
GUS :	gène de la β-glucuronidase
IP :	inhibiteur de protéase
LBA :	lectine du haricot de Lima, *Phaseolus lunatus* L.
LcH :	lectine de la lentille, *Lens culinaris* Medick.
MAA :	lectine de maackia, *Maackia amurensis* Koch
MPA :	lectine de l'oranger des osages, *Maclura pomifera*
NPA :	lectine de la jonquille, *Narcissus pseudo-narcissus* L.
OSA :	lectine du riz, *Oryza sativa* L.
PCA :	lectine du haricot d' Espagne, *Phaseolus coccineus* L.
PHA :	lectine du haricot commun, *Phaseolus vulgaris* L.
PNA :	lectine de l' arachide, *Arachis hypogaea* L.
PSA :	lectine du pois commun, *Pisum sativum* L.
PWA :	lectine de *Phytolacca americana* L.
PWG6 :	doubles construction de plasmide avec le gène de la GNA et WAI
RCA :	lectine du ricin, *Ricinus communis* L.
RIP :	protéines inhibitrices de ribosomes
RPA :	lectine du robinier faux-acacia, *Robinia pseudacacia* L.
RSA :	lectine du champignon, *Rhizoctonia solani*
SBA :	lectine du soja, *Glycine max* [L.] Merr.
SDS-PAGE :	sodium dodécyl-sulphate, polyacrylamide gel
SJA :	lectine de sophora, *Sophora japonica* L.
SNA :	lectine du sureau noir, *Sambucus nigra* L.
STA :	lectine de la pomme de terre, *Solanum tuberosum* L.
TKA :	lectine de la cucurbitacée, *Trichosanthes kirilowii* Maximow.
TL :	lectine de la tulipe, *Tulipa sp.*
UEA :	lectine de l'ajonc d'Europe, *Ulex europaeus* L.
UDA :	lectine de l'ortie dioïque, *Urtica dioica* L.
VFA :	lectine de la fève, *Vicia faba* L.
VVA :	lectine de la vesce, *Vicia villosa* Roth
WAI :	inhibiteur alpha-amylase du blé
WAI9 :	construction simple de plasmide avec le gène de la WAI
WGA :	lectine du germe du blé commun, *Triticum vulgare* Vill.

Sommaire

Avant-propos **2**
Liste des abréviations **3**
Sommaire **4**
Liste des figures 6
Liste des planches 8
Liste des tableaux 9
Listes des fiches-protocoles 10
Liste des annexes 11

Chapitre 1 - Présentation du contexte de l'étude **12**
Introduction 12
1. La biologie des pucerons implique des moyens de lutte spécifiques 13
1.1. Biologie des pucerons 13
1.2. Nécessités économiques justifiant l'étude présentée 16
1.3. Moyens actuels de lutte contre les pucerons - Avantages et inconvénients 18
2. Les plantes transgéniques offrent des perspectives prometteuses pour lutter contre les insectes ravageurs 27
2.1. Avantages et inconvénients présentés par les plantes transgéniques 27
2.2. Problème du risque d'apparition de populations d'insectes résistantes aux entomotoxines 29
2.3. Gènes exploitables pour la création de plantes transgéniques résistantes aux insectes ravageurs 30
3. Les lectines végétales sont des candidates intéressantes pour la transgénèse visant la protection des plantes 37
3.1. Histoire de la découverte des lectines - Définition générale 37
3.2. Propriétés générales des lectines 38
3.3. Action des lectines sur les insectes *in planta* et *in vivo* - Connaissances actuelles 46

Chapitre 2 - Effets des lectines sur la biologie des pucerons **50**
1. Introduction 50
2. Matériels et Méthodes 51
2.1. Origines et élevage des insectes 51
2.2. Origines des lectines purifiées testées 51
2.3. Composition et préparation des milieux artificiels 51
2.4. Principe des tests de toxicité aiguë *in vitro* 52
2.5. Caractéristiques des lignées de pommes de terre transgéniques testées 52
2.6. Estimation des taux d'expression des transgènes par immunodétection sur membrane de nitrocellulose 53
2.7. Estimation indirecte du taux d'expression des transgènes par dosage ELISA d'intestins de pucerons 54
2.8. Principe des tests à "long terme" *in vitro* ou sur plantes transgéniques 54
2.9. Méthodes d'analyse des données 56
3. Résultats 58
3.1. Effets des lectines induits par ingestion sur milieux artificiels 58
3.2. Performances biologiques de *M. persicae* et d'*A. solani* sur des pommes de terre transgéniques exprimant les gènes de la GNA et/ou de la BCH 73
4. Discussion 86

Chapitre 3 - Effet des lectines sur le comportement alimentaire des pucerons 92
1. Introduction..... 92
2. Matériels et Méthodes..... 92
2.1. *Acyrthosiphon pisum* et la Concanavaline A : le puceron et la lectine modèles testés..... 92
2.2. Principe des micro-tests de choix..... 92
2.3. Mesure du taux d'ingestion des pucerons..... 94
2.4. Technique d'électropénétrographie ou EPG..... 96
3. Résultats..... 100
3.1. La Concanavaline A est-elle phagorépulsive ? 100
3.2. Mesure des volumes de milieux ingérés par des pucerons intoxiqués par la Concanavaline A - Cinétique de l'intoxication..... 106
3.3. Étude du comportement d'alimentation d'*A. pisum* intoxiqué sur des milieux contenant de la Concanavaline A par la technique EPG..... 110
4. Discussion..... 119

Chapitre 4 - Mode d'action des lectines sur les pucerons 122
1. Introduction..... 122
2. Matériels et Méthodes..... 124
2.1. Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS..... 124
2.2. Dosage de la Concanavaline A par technique ELISA..... 125
2.3. Microscopie photonique..... 126
2.4. Microscopie électronique à transmission (MET)..... 127
2.5. Analyse des acides aminés libres de puceron entier et de miellat..... 128
3. Résultats..... 130
3.1. Les tissus cibles de la Concanavaline A..... 130
3.2. Conséquences de l'intoxication par la ConA sur la physiologie d'*A. pisum* 143
3.3. Informations complémentaires sur le mode d'action de la Con A..... 161
4. Discussion..... 168

Chapitre 5 - Conclusions et perspectives 174
1. Caractéristiques biologiques et mode d'action de la toxicité des lectines à mannose sur *A. pisum*..... 174
2. Implications des connaissances sur la toxicité des lectines sur leur potentiel d'utilisation en protection des cultures 175
3. Perspectives..... 178
4. Quel avenir pour les plantes transgéniques ?..... 179

Bibliographie 180
Publications - Communications.....194
Protocoles.....196
Annexes.....218

Liste des figures

Figure 1 - Représentation schématique du cycle de vie des pucerons en régions tempérées.....14
Figure 2 - Vue de profil de la région antérieure d'*Aphis fabae* Scop. montrant la disposition relative des différents éléments de la tête (d'après Weber, 1928 cité par Leclant, 1981).....15
Figure 3 - Vue en perspective de l'extrémité des stylets d'un puceron (d'après Taylor & Robertson, 1974 cités par Leclant, 1981).....15
Figure 4 - Extrait de : *Les amis du cultivateur*, par E. Deliège, instituteur, paru chez H. Matot à Reims, en 1903 (cité par Grison, 1992).....18
Figure 5 - Exemples de pratiques pouvant être mises en place dans le cadre d'une lutte intégrée contre les pucerons (d'après Harrewijn et Minks, 1989).....20
Figure 6 - Intégration globale et évaluation d'un projet de création de cultivars résistants aux pucerons et aux virus qui leur sont associés (d'après Comeau, 1992).....25
Figure 7 - **A.** Classification des sucres selon Mäkelä basée sur la position des groupements hydroxyles en C-3 et C-4 du cycle pyranose. **B.** Structures des sucres reconnus par les lectines des cinq principales classes.....42
Figure 8 - Dispositif expérimental mis en place pour tester les effets des plantes transgéniques sur la croissance et la fécondité des pucerons *M. persicae* et *A. solani* isolés individuellement sur une feuille.....55
Figure 9 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs de l'ACP normée se rapportant au tableau 27 (lectines) x 12 (variables : "mortalité" et "inhibition de croissance").....59
Figure 10 - Effets de deux lectines à mannose, la Concanavaline A et la lectine du perce-neige (GNA) sur la croissance du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*.....61
Figure 11 - Effets de la Concanavaline A sur la croissance de six espèces de pucerons.....62
Figure 12 - Taux de survie des larves de l'espèce *Myzus persicae* sur des milieux artificiels contenant 1500 $\mu g.ml^{-1}$ de lectine du perce-neige, *Galanthus nivalis* (GNA), de lectine de la jonquille, *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), de lectine de l'ail, *Allium sativum* (ASA) ou de lectine de *Canavalia ensiformis* (ConA).....63
Figure 13 - Effets de quatre lectines à mannose sur la croissance du puceron du pêcher, *Myzus persicae*.....64
Figure 14 - Effets de deux lectines (RSA, MAA) et de deux inhibiteurs de protéases (CpTI, WAI) sur la croissance du puceron du pêcher, *Myzus persicae*.....65
Figure 15 - Effets de doses sublétales de la Concanavaline A sur la survie et la fécondité du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*.....68
Figure 16 - Effets de doses sublétales de la Concanavaline A et de la lectine du perce-neige (GNA) sur la survie et la fécondité du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*.....72
Figure 17 - Quantités de GNA dosées dans des extraits de tissus foliaires des lignées transgéniques PWG6#85 et PBG6#47 (plantes témoins = var. Désirée).....74
Figure 18 - Quantités de GNA dosées par ELISA dans les tubes digestifs de pucerons de l'espèce *Aulacorthum solani* intoxiqués 8 jours par la lectine sur milieux artificiels.....75
Figure 19 - Performances biologiques du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, sur deux lignées de pommes de terre transgéniques, PBG6#47 et PWG6#85.....78
Figure 20 - Performances biologiques du puceron commun des serres, *Aulacorthum solani*, sur deux lignées de pommes de terre transgéniques, PBG6#47 et PWG6#85.....81
Figure 21 - Performances biologiques du puceron commun des serres, *Aulacorthum solani*, sur trois lignées de pommes de terre transgéniques, GNA2#23, GNA2#28 et GNA2#30.....84
Figure 22 - Performances biologiques du puceron commun des serres, *Aulacorthum solani*, sur trois lignées de pommes de terre transgéniques, GNA2#23, PWG6#85 et WAI9#12 (complément figure 21).....85
Figure 23 - Dispositif mis en place pour tester des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* en condition de choix entre deux milieux de compositions différentes.....93
Figure 24 - Dispositif mis en place pour mesurer individuellement les quantités de milieux marqués à l'inuline ^{14}C ingérées par des pucerons (larves ou adultes).....94
Figure 25 - Protocole pour mesurer les quantités de milieu marqué ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum*, préalablement intoxiquées ou non.....95
Figure 26 - Représentation schématique d'un puceron en position de recherche de nourriture sur une feuille.....96
Figure 27 - Schéma simplifié du circuit électrique d'enregistrement d'un EPG sur milieu artificiel.....97
Figure 28 - Comportement de larves de l'espèce *A. pisum* mises en condition de choix entre deux milieux de compositions différentes.....102

Figure 29 - Comportement de larves de l'espèce *A. pisum* intoxiquées par de la Concanavaline A à 400 µg.ml^{-1} puis mises en condition de choix entre deux milieux de compositions différentes.....103
Figure 30 - Comportement de larves de l'espèces *A. pisum* mises en condition de choix entre du milieu standard Ap2 et une solution de saccharose à 10 %.....105
Figure 31 - Quantités de milieu marqué (^{14}C inuline = *) avec ou sans ConA (200 µg.ml^{-1}) ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* pendant des durées comprises entre 2 h et 16 h.....107
Figure 32 - Quantités de milieu marqué (^{14}C inuline = *) avec ou sans ConA (400 µg.ml^{-1}) ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* pendant des durées comprises entre 2 h et 48 h.....107
Figure 33 - Quantités de milieu ingérées en 48 h par des pucerons adultes de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* fixés sur des milieux standards Ap2 contenant 200, 400 ou 800 µg.ml^{-1} de Concanavaline A.....109
Figure 34 - Analogies entre le type d'ondes C et G observables sur les enregistrements EPG d'un puceron de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur pois et les ondes induites par des insectes de cette même espèce sur milieu artificiel.....111
Figure 35 - Analogie entre le type d'ondes pd observable sur les enregistrements EPG d'un puceron sur plante et des ondes induites par un puceron sur milieu artificiel. Les ondes pd sont corrélées à une activité de pénétration des stylets dans une cellule.....112
Figure 36 - Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur des milieux standards simples ou contenant 400 µg.ml^{-1} de Concanavaline A. Superposition des courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA400) pour trois durées d'acquisition (4 h, 8 h & 24 h) et position des moyennes (1 & 2) pour les 11 variables retenues dans l'analyse.....116
Figure 37 - Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur des milieux standards simples ou contenant 600 µg.ml^{-1} de Concanavaline A. Superposition des courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA600) pour trois durées d'acquisition (4 h, 8 h & 24 h) et position des moyennes (1 & 2) pour les 11 variables retenues dans l'analyse.....117
Figure 38 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs de l'ACP normée exécutée sur le tableau des données relatives aux enregistrements EPG de 24 h réalisés avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur des milieux standards simples ou contenant 600 µg.ml^{-1} de Concanavaline A.....118
Figure 39 - Descriptif de la démarche et des techniques utilisées pour l'étude du mode d'action cellulaire de la Concanavaline A sur le puceron *Acyrthosiphon pisum*.....123
Figure 40 - Comparaison des profils électrophorétique d'extraits secs de miellat de pucerons laissés 72 h sur des milieux standards simples (d), contenant 100 µg.ml^{-1} de ConA (e), ou 100 µg.ml^{-1} de peroxydase (f), ou les deux protéines à ces mêmes concentrations (g).....130
Figure 41 - Estimations : **B :** des quantités de ConA excrétées dans le miellat de pucerons laissés 72 h sur milieu contenant 200 (C2), 400 (C4) ou 800 (C8) µg.ml^{-1} de lectine (dosage ELISA) ; **C :** des quantités de ConA ingérées en 48 h par des pucerons sur ces différents types de milieu (dosage à l'aide d'un marqueur radioactif). **A :** gamme étalon dosage ELISA.....131
Figure 42 - Comparaison des profils électrophorétiques des broyats d'estomacs de pucerons adultes *A. pisum* laissés 72 h sur des milieux Ap2 simples (a) ou contenant 200 µg.ml^{-1} (b), 400 µg.ml^{-1} (c) ou 800 µg.ml^{-1} (d) de ConA.....133
Figure 43 - Vue dorsale du tube digestif d'une larve d'*Acyrthosiphon pisum* au dernier stade larvaire (L4).....135
Figure 44 - Vue sagittale (A) et transversale (B) d'une larve de *Myzus persicae* (d'après Ponsen, 1972) montrant en particulier la position de l'oesophage (f), de l'estomac (st), de l'intestin (i) et du rectum (hg).....137
Figure 45 - Section transversale du tube digestif d'une larve de *Myzus persicae* au niveau de l'estomac antérieur (A), de l'estomac intermédiaire (B), de l'estomac postérieur (C), de la première partie de l'intestin (D) et de la deuxième partie de l'intestin (E). La figure F représente une section transversale du tube digestif d'un adulte *Acyrthosiphon pisum*, au niveau de la section tubulaire du proctodeum (d'après Ponsen, 1972 & 1987).....138
Figure 46 - Dosage ELISA de la ConA dans des broyats de tubes digestifs de pucerons intoxiqués ou non par de la lectine, incubés dans une solution de PBS contenant 500 ng de ConA par équivalent tube digestif.....142
Figure 47 - Représentation schématique et synthétique des résultats du dosage par chromatographie des acides aminés libres de broyats de pucerons laissés 48 h sur des milieux Ap2 contenant de la ConA ou de la GNA.....154

Figure 48 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs des AFC réalisées sur les données relatives aux acides aminés libres dosés dans les broyats de pucerons.....155
Figure 49 - Représentation schématique et synthétique des résultats du dosage par chromatographie des acides aminés libres de miellats de pucerons laissés 48 h sur des milieux Ap2 contenant de la ConA ou de la GNA.....157
Figure 50 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs des AFC réalisées sur les données relatives aux acides aminés libres dosés dans les miellats de pucerons.....160
Figure 51 - Comparaison des effets de la ConA et de la GNA à faibles concentrations sur la croissance du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*.....161
Figure 52 - Comparaison des effets de lectines à mannose/glucose sur la croissance (A) du puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum* ; (B) du puceron du pêcher, *Myzus persicae*. Concentrations inhibitrices exprimées en moles.ml^{-1} de milieu.....164
Figure 53 - Résultats graphiques des expériences d'inhibition compétitive de la toxicité de trois lectines à mannose/glucose par le mannose et le mannane.....165
Figure 54 - Représentation schématique des différentes phases de sécrétion naturelle (1 à 4) d'une cellule épithéliale de l'estomac intermédiaire de *Myzus persicae* (d'après Ponsen, 1972 & 1987).....169

Liste des planches

Planche I - Coupes transversales d'une larve d'*Acyrthosiphon pisum* ayant ingéré de la ConA fluorescente : **A :** coupe au niveau de l'estomac antérieur, x 125 ; **B :** coupe au niveau de l'estomac intermédiaire, x 125 ; **C :** estomac postérieur, x 500.....140

Planche II - Coupes transversales d'une larve d'*Acyrthosiphon pisum* au niveau de l'estomac intermédiaire : larve non intoxiquée : **A,** x 500 ; larve ayant ingéré du milieu contenant 10 µg.ml^{-1} de ConA : **B1**, x 500 ; **B2**, x 1250 ; larve ayant ingéré du milieu contenant 400 µg.ml^{-1} de ConA : **C1**, x 500 ; **C2**, x 1250.....144

Planche III - Immunohistochimie sur coupes de larves d'*Acyrthosiphon pisum* intoxiquées par la ConA. Les coupes (estomac intermédiaire) sont soumises à un anticorps anti-ConA et la lectine est visualisée par la coloration brune. Toutes les lames sont colorées au bleu de toluidine. Larve non intoxiquée, **A** ; larve intoxiquée à la concentration de 200 µg.ml^{-1}, **B1** & **B2** ; larve intoxiquée à la concentration de 400 µg.ml^{-1}, **C** et 800 µg.ml^{-1}, **D**. Témoin de spécificité, **E** (ConA400). Grosissement x 500 excepté pour B2, x 1250.....145

Planche IV - Immunohistochimie sur coupes de larves d'*Acyrthosiphon pisum* intoxiquées par la ConA (800 µg.ml^{-1}). Les coupes localisent la lectine dans les différentes régions du tubes digestif.....148

Planche V - Observations au microscope électronique à transmission de l'ultrastructure des cellules mésentériques d'une larve du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*.....149

Planche VI - Observations au microscope électronique à transmission de l'ultrastructure de la face apicale d'une cellule mésentérique d'une larve du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* intoxiquée pendant 48 h sur un milieu contenant 400 µg.ml^{-1} de ConA.....152

Liste des tableaux

Tableau 1 - Exemples d'antagonistes potentiellement utilisables pour lutter contre des pucerons.....22

Tableau 2 - Tactiques d'utilisation *in planta* de gènes gouvernant la synthèse de protéines entomotoxiques (d'après McGaughey et Whalon, 1992).....30

Tableau 3 - Exemples de protéines toxiques utilisables pour la protection des plantes contre des insectes (non exhaustif).....31-32

Tableau 4 - Exemples de plantes transgéniques produites pour la résistance à des insectes (non exhaustif).....34

Tableau 5 - Origines et caractéristiques moléculaires des lectines végétales testées sur les pucerons.....39-40

Tableau 6 - Spécificités osidiques des lectines végétales testées sur différentes espèces de pucerons, en particulier *Acyrthosiphon pisum*.....43

Tableau 7 - Exemples de propriétés biologiques des lectines et des applications qui en résultent (d'après Lis & Sharon, 1986).....44

Tableau 8 - Effets de doses sublétales de ConA sur la croissance, la survie, et la fécondité du puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum*.....67

Tableau 9 - Effets de doses sublétales de ConA ou de GNA sur la croissance, la survie, et la fécondité du puceron du pêcher, *Myzus persicae*.....71

Tableau 10 - Performances biologiques du puceron du pêcher, *Myzus persicae*, sur pommes de terre transgéniques.....77

Tableau 11 - Performances biologiques d'*Aulacorthum solani*, sur pommes de terre transgéniques (février 1994).....80

Tableau 12 - Performances biologiques d'*Aulacorthum solani* sur pommes de terre transgéniques (janvier 1995).....83

Tableau 13 - Quantités de milieu Ap2 marqué avec ou sans ConA (200 µg.ml^{-1}) ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* préalablement intoxiquées ou non (ConA à 400 µg.ml^{-1}) pendant des durées de 2h à 16 h.....106

Tableau 14 - Quantités de milieu Ap2 marqué avec ou sans ConA (400 µg.ml^{-1}) ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* préalablement intoxiquées ou non (ConA à 400 µg.ml^{-1}) pendant des durées de 2h à 48h.....108

Tableau 15 - Variables retenues pour l'analyse statistique des enregistrements EPG obtenus avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur milieux standards simples ou contenant de la Concanavaline A.....113

Tableau 16 - Valeurs moyennes de chacune des 11 variables retenues pour l'analyse statistique des enregistrements EPG obtenus avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur milieux standards simples ou contenant de la Concanavaline A.....115

Listes des fiches-protocoles

Fiche N°1 - Origine et élevage des pucerons.....197

Fiche N°2 - Références des lectines végétales testées sur pucerons.....197

Fiche N°3 - Composition du milieu standard Ap2.....198

Fiche N°4 - Préparation des milieux Ap2.....198

Fiche N°5 - Dosage de la GNA par immunodétection sur membrane de nitrocellulose. Technique par dépôt en tache ("Dot-Blot").....199

Fiche N°6 - Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976).....200

Fiche N°7 - Détection de la GNA dans des feuilles de pomme de terre par chimioluminescence (Enhanced Luminescence Detection-"ECL Tissue Blot").....201

Fiche N°8 - Dissection des tubes digestifs de pucerons.....202

Fiche N°9A - Dosage spécifique de la ConA par une méthode immunoenzymatique quantitative, l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....203

Fiche N°9B - Dosage de la ConA par ELISA - procédé BRAB.....204

Fiche N°10A - Dosage spécifique de la GNA par une méthode immunoenzymatique quantitative, l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....205

Fiche N°10B - Méthode indirecte de dosage de la GNA par ELISA (protocole Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.).....205

Fiche N°11 - Ajustement des données d'inhibition de croissance des pucerons au modèle de Michaelis-Menten.....206

Fiche N°12 - Définition du taux intrinsèque d'accroissement naturel (r_m) d'une population de pucerons.....207

Fiche N°13 - Principe de la méthode du Jackknife pour estimer la variance du r_m d'une population de pucerons.....208

Fiche N°14A - Modélisation de la dynamique de ponte des pucerons (Guy Bonnot, comm. pers.).....209

Fiche N°14B - Justification du choix du modèle utilisé pour décrire la dynamique de ponte des pucerons.....210

Fiche N°15 - Mesure de l'ingestion de milieu marqué (inuline ^{14}C = *).....211

Fiche N°16 - Récolte du miellat excrété par des pucerons sur milieu artificiel.....211

Fiche N°17 - Protocole d'électrophorèse sur plaque de gel.....212

Fiche N°18 - Préparation des échantillons de miellat, de tube digestif et d'hémolymphe avant dosage de la ConA par ELISA.....213

Fiche N°19 - Solution physiologique insecte : liquide Yeager (Nardon, 1978).....213

Fiche N°20 - Préparation des coupes histologiques.....214

Fiche N°21 - Préparation des tampons phosphates (Sorensen) à x M (zone tampon : 5,0 à 8,2).....215

Fiche N°22A - Fixateurs utilisés pour la fixation des larves de pucerons en vue d'observations en microscopie électronique à transmission.....216

Fiche N°22B - Fixation et déshydratation des larves de pucerons en vue d'observations en microscopie électronique à transmission.....216

Fiche N°22C - Inclusion dans la "London Resin White" (Newman *et al.*, 1982).....217

Fiche N°23 - Extraction des acides aminés libres (broyats de pucerons, extraits de miellat).....217

Liste des annexes

Annexes 1A-F - Fiches descriptives des six espèces de pucerons utilisées au cours de notre travail : *Acyrthosiphon pisum, Aphis gossypii, Myzus persicae, Aulacorthum solani, Macrosiphum euphorbiae, Macrosiphum albifrons*(d'après Blackman et Eastop).....219-221

Annexe 2 - Exemples d'espèces aphidiennes résistantes aux insecticides (d'après Devonshire, 1989).....222

Annexes 3A & B - Mode d'action de la lectine du haricot, PHA et de la Concanavaline A sur des animaux de laboratoires (rats principalement-tableau non exhaustif).....223

Annexe 4 - Tableau des données brutes sur lequel l'ACP de la figure 9 a été réalisée.....224

Annexe 5 - Notice d'utilisation du programme "Toxicologie™.....224

Annexe 6 - Corrélation entre le type d'ondes enregistrées sur un graphe d'EPG et les activités de pénétration des stylets d'un puceron (Tjallingii, 1990, Van Helden, 1995) - Représentation schématique des différents types d'ondes observables sur un EPG (Tjallingii, 1988).....225

Annexe 7A - Fenêtre de travail du logiciel d'analyse des données EPG "MacStylet™".....226

Annexe 7B - Statistiques calculées par MacStylet™.....226

Annexe 8 - Discriptif schématique du dispositif élaboré pour enregister le comportement d'alimentation des pucerons sur milieu artificiel.....227

Annexes 9A-F - Descriptifs graphiques des analyses statistiques des enregistrements EPG réalisés avec *A. pisum* sur milieux standards simples ou contenant 400 ou 600 $\mu g.ml^{-1}$ de ConA - Histogrammes et courbes de Gauss par modalité pour des durées d'acquisition de 4h, 8h et 24h, pour chacune des 11 variables retenues dans les analyses.....228-230

Annexe 10 - Résultats des dosages ELISA réalisés sur une gamme de Concanavaline A (0,01 à 10000 ng/puits) avec 3 concentrations différentes de conjugué.....231

Annexe 11 - Représentation schématique de tubes digestifs de différentes espèces aphidiennes (Ponsen, 1987).....231

Annexes 12A-C - Tableaux des résultats des analyses des acides aminés libres de pucerons entiers et de leur miellat (pucerons laissés 48 h sur milieux ConA ou GNA).....232-233

Annexe 13 - Abréviations utilisées dans les figures 44, 45 et 54 (Ponsen, 1972, 1987).....333

Chapitre 1

Présentation du contexte de l'étude

Introduction

Les pucerons infestent la plupart des plantes cultivées, et constituent un des groupes d'insectes les plus nuisibles en régions tempérées. Les dégâts sont causés par des toxicoses ou des affaiblissements de l'hôte. Ils sont d'autant plus graves que ces insectes possèdent un formidable pouvoir de multiplication. Par ailleurs, les pucerons sont les principaux vecteurs de virus végétaux. Leur contrôle chimique pose souvent des problèmes du fait qu'ils se fixent généralement à la face inférieure des feuilles et qu'ils sont difficiles à atteindre par les traitements, et les cas de résistance aux produits chimiques sont de plus en plus fréquents.

L'utilisation de variétés résistantes apparaît aujourd'hui comme l'une des composantes majeures de la stratégie de lutte contre ces insectes. L'introduction dans le génome du végétal d'une partie des facultés de défense de la culture est en effet un objectif séduisant et la sélection variétale classique a déjà permis d'enregistrer des résultats intéressants contre de très nombreux insectes (Smith, 1993). Mais cette approche présente néanmoins des limites et des inconvénients. Elle suppose notamment que le sélectionneur dispose de gènes de résistance transférables dans l'espèce végétale considérée et que ces gènes ne soient pas liés à des caractères agronomiques indésirables. Le transfert et l'expression de gènes "étrangers" dans les plantes par les techniques du génie génétique constituent un moyen actuellement disponible pour contourner les difficultés inhérentes à la sélection variétale classique.

Depuis quelques années, l'**Institut National de la Recherche Agronomique** (INRA) a développé des programmes de défense des plantes par transfert de gènes. L'un d'eux vise à la création de plantes résistantes aux virus (Legavre, 1993; Zaccomer, 1993). D'autres programmes se rapportent aux insectes phytophages, et des travaux ont été réalisés sur différents modèles végétaux : tabac (*Nicotiana tabaccum* L. ; Jouanin *et al.*, 1990), chou (*Brassica oleracea* L. ; Berthomieu, 1992), cotonnier (*Gossypium hirsutum L.* ; LeTan-Dumanois, 1994) et colza (*Brassica napus oleifera* ; Bonadé Bottino, 1993) Des gènes codant pour différentes protéines entomopathogènes (toxine bactérienne et/ou inhibiteurs de protéase) sont utilisés.

Un projet est également initié pour tester la faisabilité de la création d'une plante transgénique résistante à un puceron. Le modèle choisi est celui d'une cucurbitacée (concombre ou melon) et de sa résistance au puceron polyphage *Aphis gossypii* Glover. Ce projet est à l'origine d'une collaboration entre le laboratoire de Biologie Cellulaire de l'INRA de Versailles (Lise Jouanin), le laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Durham en Grande Bretagne (Angharad Gatehouse) et le laboratoire de Biologie Appliquée de l'INRA-INSA Lyon (Yvan Rahbé).

Le travail décrit dans cette thèse constitue l'une des étapes de ce programme de recherche, l'objectif en étant de **caractériser la toxicité de protéines** purifiées vis-à-vis des pucerons et d'étudier le **mécanisme de la toxicité** des molécules candidates, en l'occurrence des **lectines végétales** de la classe des lectines à mannose : la Concanavaline A (ConA), la lectine de la légumineuse tropicale *Canavalia ensiformis* [L.] DC et la lectine du perce-neige (*Galanthus nivalis* L., GNA). Connaître le mécanisme de la toxicité est important dans la mesure où cela permet : -1) de surmonter de façon rationnelle les difficultés éventuelles de mise en oeuvre de la stratégie ; -2) de mieux comprendre et de suivre d'éventuelles apparitions de populations d'insectes résistant aux entomotoxines introduites, et donc de juger de la pertinence d'exploiter ou non les gènes des protéines candidates.

Pour des raisons méthodologiques et pratiques, notre travail est essentiellement axé sur le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum* Harris. Mais notre étude vise à trouver une(des)

lectine(s) toxique(s) pour les pucerons en général et *A. pisum* ne constitue donc qu'un modèle support de nos recherches. Cela explique qu'à plusieurs reprises, nous ayons effectué des expériences sur d'autres espèces d'aphides.

Le **premier chapitre** de cette thèse traite dans un premier temps de la biologie des pucerons, de l'adaptation à leurs plantes hôtes et de la gravité des dégâts qu'ils engendrent : autant de caractéristiques qui illustrent leur importance économique et impliquent des moyens de lutte spécifiques. Nous les décrivons brièvement pour mieux montrer ensuite l'intérêt de la création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Le chapitre se poursuit alors par une revue des protéines entomopathogènes exploitables pour cette nouvelle stratégie. Nous insistons sur le potentiel d'utilisation des lectines végétales pour lutter contre les ravageurs phytophages, et en particulier les Homoptères.

Nos **résultats** sont détaillés dans **trois chapitres**. Le premier d'entre eux décrit la démarche qui nous a conduit à nous intéresser aux lectines à mannose/glucose. Les effets de ces protéines sur la biologie des pucerons (survie, croissance, fécondité) sont caractérisés par des tests d'intoxication aiguë ou sublétale sur des milieux artificiels. Les performances biologiques d'aphides sur des pommes de terre transgéniques exprimant le gène de la GNA sont discutées. Le second chapitre constitue la première étape dans la caractérisation du mode d'action des lectines sur les pucerons. Des tests de choix, des mesures de l'ingestion à l'aide d'un traceur radioactif ainsi que l'observation de leur comportement alimentation par electropénétrographie, permettent de préciser les effets des lectines sur la prise de nourriture. Le dernier chapitre "Résultats" a pour but de préciser les étapes de l'intoxication cellulaire au niveau des tissus cibles de la Concanavaline A.

En **conclusion,** outre les perspectives découlant de notre travail, nous évoquons également d'une manière plus générale l'avenir des plantes transgéniques.

1. La biologie des pucerons implique des moyens de lutte spécifiques

1.1. Biologie des pucerons

1.1.1. L'adaptation des pucerons à leurs plantes-hôtes

Les pucerons ou aphides constituent un groupe d'insectes extrêmement répandu dans le monde et qui s'est diversifié parallèlement à celui des plantes à fleurs (Angiospermes) dont presque toutes les espèces sont hôtes d'aphides (Heie, 1987 ; Shaposhnikov, 1987). Il en existe également sur les Gymnospermes, ainsi que sur quelques espèces de Ptéridophytes et Bryophytes. La plupart des genres de pucerons sont inféodés à une famille végétale[1], en ce sens, ils sont dits monophages. Mais nombre des pucerons s'attaquant aux plantes cultivées ont un régime alimentaire moins restreint et se nourrissent sur des végétaux de familles très distinctes. L'espèce *A. gossypii* est l'archétype des pucerons polyphages, elle se développe aussi bien sur le coton (malvacée), que sur le melon (cucurbitacée). C'est dans les zones tempérées que l'aphidofaune est la plus variée. Mais ces insectes sont présents aussi bien sous les climats tropicaux que dans les zones subarctiques (Dixon, 1987 ; Strathdee *et al.*, 1993 ; Bale *et al.*, 1994 ; Heie, 1994).

D'un point de vue général, les aphides possèdent trois caractéristiques marquées :

-1) ils sont **paurométaboles** : leurs différents stades larvaires ressemblent aux adultes (mis à part l'absence d'ailes développées pour les futurs ailés), ont le même mode de vie, se nourrissent de la même manière et font les mêmes types de dégâts que ces derniers.

---

1 90 % des espèces aphidiennes se nourrissent sur des hôtes appartenant au même genre ou à la même famille de végétaux.

Le développement larvaire des espèces étudiées au cours de notre travail peut-être schématisé[2] :

$$L_1 \rightarrow L_2 \begin{cases} \rightarrow L_3 \rightarrow L_4 \rightarrow VA \\ \rightarrow N_3 \rightarrow N_4 \rightarrow VL \end{cases}$$

-2) ils sont **plurivoltins** et présentent donc plus de deux générations par an. Leur cycle évolutif est **hétérogonique**, c'est-à-dire caractérisé par l'alternance entre une génération amphisexuelle (comportant des mâles et des femelles fécondables) et une ou généralement plusieurs générations ne comportant que des femelles **parthénogénétiques**. Les femelles fécondées sont toujours ovipares, alors que les femelles parthénogénétiques sont vivipares (elles donnent directement naissance à de jeunes larves capables de s'alimenter et de se déplacer aussitôt produites). Dans nos régions tempérées, les pucerons présentent en général un cycle annuel complet (holocycle) qui comprend la génération amphisexuelle :

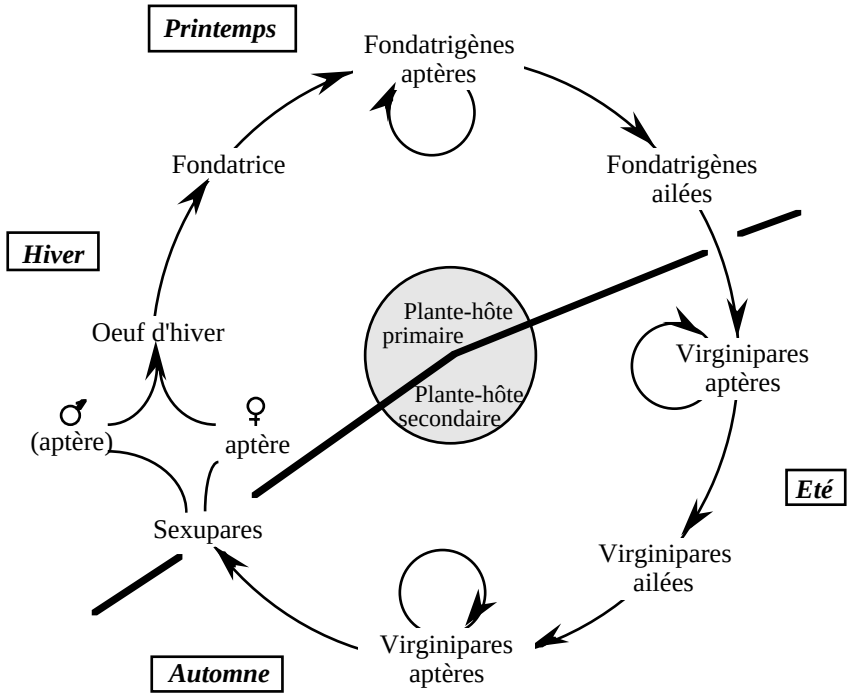


Figure 1 - Représentation schématique du cycle de vie des pucerons en régions tempérées.

En réalité, dans une région donnée, l'adaptation des pucerons aux conditions particulières du milieu peut se traduire par de nombreuses variantes au niveau des phases du cycle (changement de plante hôte appartenant à une même espèce ou non ; perte de la possibilité de se reproduire par voie sexuée (pour revue : Dedryver, 1982). La représentation ci-dessus est donc effectivement très schématique et ne traduit que partiellement la complexité des cycles chez les pucerons.

Au cours de ce cycle les morphes apparaissent successivement, parmi lesquels les virginipares qui ont fait l'objet de notre étude. Celles-ci sont les formes femelles à reproduction parthénogénétique, qui sont à l'état adulte soit ailées, soit aptères. Ces dernières ont un rôle essentiellement reproductif, alors que les ailées assurent d'abord la dispersion des colonies (Miyazaki, 1987).

[2] Avec L3 et L4 : larves d'aptères du 3ème et 4ème stade ; N3 et N4 : larves à ptérothèques du 3ème et 4ème stade : VA : adulte virginipare aptère ; VL : adulte virginipare ailé.

-3) ils appartiennent à l'ordre des Hémiptères, sous-ordre des **Homoptères** (Blackman et Eastop, 1985) au même titre que les cicadelles, les psylles, les aleurodes ou les cochenilles (Blackman et Eastop, 1985 ; Alford *et al.*, 1994). Ils se nourrissent tous exclusivement aux dépens des plantes (phytophages) et possèdent un **système buccal** de **type piqueur-suceur :**

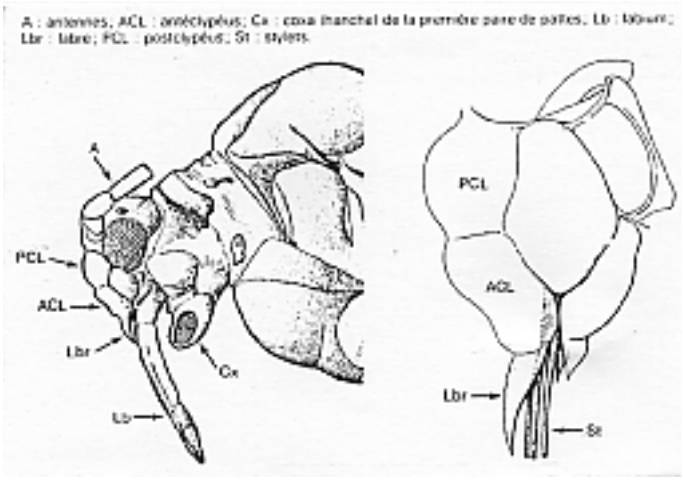


*Figure 2 - Vue de profil de la région antérieure d'*Aphis fabae *Scop. montrant la disposition relative des différents éléments de la tête (d'après Weber, 1928 cité par Leclant, 1981).*

; leurs pièces buccales sont transformées et adaptées au prélèvement d'une alimentation liquide non disponible en surface : mandibules et maxilles ont la forme de stylets accolés en faisceau sur leur longueur, qui coulissent les uns par rapport aux autres en délimitant les canaux salivaire et alimentaire :

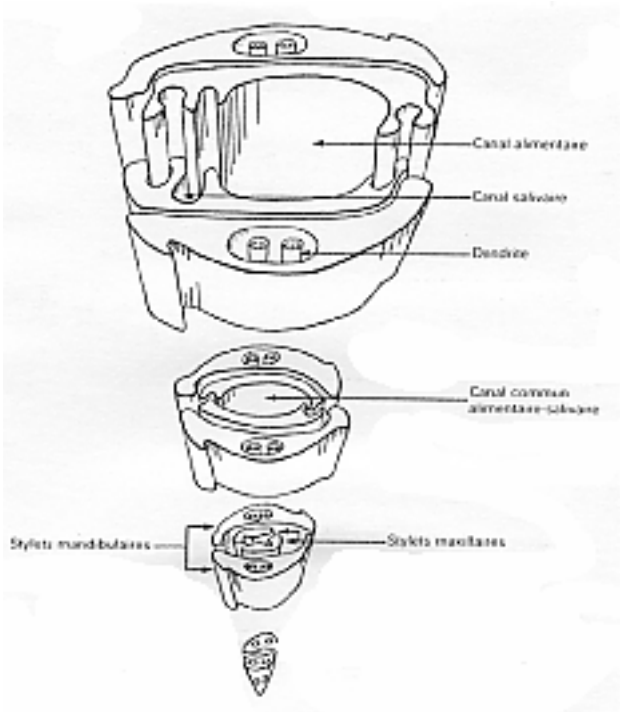


Figure 3 - Vue en perspective de l'extrémité des stylets d'un puceron (d'après Taylor & Robertson, 1974 cités par Leclant, 1981).

Les stylets permettent aux pucerons d'effectuer des piqûres dans les plantes et d'atteindre les faisceaux cribro-vasculaires du phloème, transporteurs de la sève élaborée (aliment quasi-exclusif des pucerons). Au fur et à mesure que l'insecte enfonce ses stylets dans la plante, il injecte une salive qui durcit autour de ceux-ci, formant une gaine sétale, sorte de fourreau

rigide à l'intérieur duquel l'aphide peut manoeuvrer ses stylets, les ressortir s'il est importuné ou effectuer une nouvelle piqûre (Klinghauf, 1987 ; Miles, 1987). Le comportement d'alimentation des pucerons est analysé plus en détail dans le Chapitre 3.

1.1.2. L'importance des dégâts causés par les pucerons

Le mode de nutrition des pucerons induit plusieurs types de dommages chez les plantes :

-1) l'émission de salive ou le simple fait d'enfoncer les stylets dans la plante peut être une occasion de **transmission de particules virales** (Sylvester, 1988 ; 1989). Les cinq espèces : *A. gossypii*, *A. pisum*, *Aulacorthum solani* (Kaltenbach), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) et *Macrosiphum albifrons* Essig peuvent ainsi transmettre 30 à 50 maladies virales différentes, alors que *Myzus persicae* (Sulzer)[3] est connue pour être l'espèce vectrice la plus importante, pouvant inoculer plus de 120 virus (Blackman et Eastop, 1985 ; annexe 1C).

-2) la **salive** sécrétée, entre autres lors de l'insertion des stylets, provoque fréquemment une réaction du végétal. La salive de certaines espèces aphidiennes telles que *Schizaphis graminum* (Rondani) et *Diuraphis noxia* (Mordvilko) est en effet toxique (Miles, 1990 ; Comeau, 1992). La crispation des feuilles ou la formation de galles constituent des réactions spectaculaires souvent observées (Forrest, 1987).

-3) les pucerons prélèvent directement dans la sève phloémienne une partie des produits de la photosynthèse, dont les acides aminés essentiels à la plante. Ces prélèvements, lors d'infestations massives par les pucerons, peuvent provoquer un **arrêt de la croissance** de la plante (Miles, 1989).

-4) les produits non assimilés ou transformés par l'insecte forment le **miellat** rejeté par l'anus sur la plante. Ce miellat non toxique en lui-même, peut, soit agir directement en occultant les stomates, soit, lorsqu'il est trop abondant, provoquer à la surface des feuilles un effet osmotique de nature à créer un appel d'eau à travers la membrane semi-perméable constituée par l'épiderme de la feuille. L'eau ainsi soutirée de la plante s'évapore très facilement, et le miellat agit alors comme un drain dessicant très actif, rapidement mortel dans des conditions favorisant l'évaporation (Comeau, 1992).

-5) les pucerons peuvent favoriser la prolifération de **maladies fongiques**, soit en transportant des spores (Huang *et al.*, 1981), soit en occasionnant une plus forte capture de spores lorsque la plante devient gluante de miellat (Comeau, 1992).

-6) enfin, le miellat constitue un milieu riche pour le **développement** de **champignons saprophytes** qui noircissent notamment les parties consommables des plantes. Ce noircissement créé par les spores des champignons est appelé fumagine et rend impropre la commercialisation des fruits.

1.2. Nécessités économiques justifiant l'étude présentée

Agronomiquement parlant, le puceron du melon *A. gossypii* constitue l'insecte cible principal des travaux menés actuellement à l'INRA dans le domaine de la protection des plantes maraîchères contre les insectes. Cette espèce est rencontrée dans presque tous les pays du monde. C'est un des pucerons les plus polyphages connus, s'attaquant à un nombre considérable de plantes herbacées appartenant aux familles les plus variées. Il possède cependant une préférence marquée pour les Cucurbitaceae (melon, concombre, pastèque), ainsi que pour le cotonnier et autres Malvaceae (*Hibiscus*). En France, *A. gossypii* est l'espèce

[3] Les six espèces citées ont été utilisées au cours de notre travail. Elles sont plus communément appelées respectivement puceron du melon, puceron du pois, puceron commun des serres, puceron de la pomme de terre, puceron du lupin et puceron vert du pêcher.

la plus fréquemment rencontrée dans les cultures de melon ou de concombre du Sud-Est. Mais, elle s'étend en fait à toutes les régions en champs ou en serres. Ce puceron est surtout dangereux comme vecteur de virus : il transmet au melon les virus de la mosaïque du concombre (CMV), de la mosaïque de la pastèque 1 et 2 (WMV1 et WMV2) et du rabougrissement jaune du melon (MYSV) (Pitrat et Lecoq, 1982). Les difficultés croissantes rencontrées pour combattre *A. gossypii* par les méthodes de lutte chimique conventionnelles conduisent à essayer d'obtenir des variétés résistantes, soit par la sélection variétale classique (Pitrat et Lecoq, 1982), soit par la création de plantes transgéniques exprimant une ou des protéine(s) insecticide(s).

Dans l'Introduction, nous avons précisé que notre démarche s'inscrit dans un programme élaboré au sein de l'INRA et visant à la création d'une cucurbitacée transgénique résistante à cet insecte. Deux espèces végétales, le concombre (*Cucumis sativus* L.) ou le melon (*Cucumis melo* L.) sont visées dans ce programme. Le choix futur de l'une ou l'autre de ces deux espèces pour la réalisation des transformations génétiques sera fonction des facilités de transformation et de régénération, des connaissances génétiques acquises sur ces espèces ainsi que de l'intérêt scientifique de créer une plante transgénique si l'approche de la sélection variétale classique parait offrir des solutions.

Le puceron du pois *A. pisum* constitue cependant l'insecte modèle utilisé au cours de notre étude. Trois raisons essentielles expliquent ce choix :

-1) cette espèce est à l'heure actuelle la plus étudiée au point de vue physiologique, et elle est utilisée depuis plus de 7 ans au Laboratoire de Biologie Appliquée de l'INSA de Lyon pour des études sur la nutrition ;

-2) *A. pisum* est facile à manipuler, il se maintient au moins pendant deux générations sur milieu artificiel, et sa taille relativement grande par rapport à d'autres espèces rend les études sur sa physiologie plus aisées (dissection, histologie) ;

-3) notre démarche vise en réalité la recherche d'une lectine toxique pour les pucerons au sens large, et non pas seulement pour le puceron du melon. Au vu des arguments précédents *A. pisum* constitue un modèle d'étude adéquat.

Les pucerons *A. solani*, *M. euphorbiae* et *M. persicae* posent également de graves problèmes économiques, principalement en serre pour les deux premiers, et en culture de pleins champs ou en verger pour le troisième. Ces trois espèces sont très polyphages et se développent rapidement sur les Solanées telle la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) ou l'aubergine (*Solanum melongena* L.). Elles ont été choisies afin de tester, à l'Université de Durham, des lignées transgéniques de pommes de terre exprimant des protéines insecticides.

Nous disposions également au laboratoire d'une souche du puceron du lupin, *M. albifrons*. Il nous a semblé intéressant de le tester car, contrairement aux trois espèces citées précédemment, ce puceron se caractérise par une grande spécificité alimentaire ; il n'est en effet inféodé qu'au genre *Lupinus*. Disposant de pucerons aux régimes alimentaires très variés (du monophage strict au très polyphage), nous pouvions dès lors observer si cette caractéristique pouvait influer sur le degré de toxicité induite des lectines.

Pour chacune des six espèces d'Homoptères qui viennent d'être citées, des précisions sur leur biologie, leurs plantes hôtes et les virus qu'elles transmettent sont reportées en Annexe 1 (A à F).

1.3. Moyens actuels de lutte contre les pucerons - Avantages et inconvénients

Plusieurs stratégies ont été développées pour combattre les pucerons. Très rudimentaires il y a encore 50 ans, les méthodes de lutte devinrent plus efficaces avec l'apparition des produits chimiques de synthèse. Aujourd'hui, la lutte contre les insectes fait appel au concept de lutte intégrée. Celle-ci implique l'emploi judicieux et harmonieux de plusieurs moyens de lutte : si les pesticides chimiques ne sont pas exclus, la lutte biologique et la sélection variétale (classique ou transgénèse) sont des armes privilégiées. Les paragraphes suivants décrivent ces différents moyens utilisés pour combattre les pucerons.

1.3.1. La lutte chimique : une méthode de lutte rapide et efficace

Avant la seconde guerre mondiale, la lutte chimique contre les aphides se limite à l'application de solutions à base d'arsenic ou de nicotine :

> *"L'énormité des dégâts causés par les pucerons est due à la prodigieuse fécondité de ces insectes.*
>
> *D'après Réaumur, les pucerons peuvent fournir dix générations par an.*
>
> *Une femelle pond ordinairement une cinquantaine d'oeufs ou même de petits pucerons qui seront tous des femelles.*
>
> *Celles-ci pondent à leur tour d'autres femelles dont les générations se succèdent jusqu'en automne.*
>
> *Il en résulte que les descendants de la première femelle seraient en automne de 30 billions d'individus pour 8 générations de 20 femelles chacune.*
>
> *Aussi, a-t-on pu dire que la végétation entière du globe viendrait à disparaître si ces insectes se multipliaient sans interruption.*
>
> *(...) Le cultivateur s'en débarrasse de différentes manières :*
>
> *Par l'écrasement à la main sur les plantes basses et à rameaux peu nombreux ;*
>
> *Par la taille en janvier et février des bouts de branches où les pucerons déposent leurs oeufs avec incinération immédiate de ces branches ;*
>
> *Par les injections d'eau froide ou même d'eau de chaux phéniquée, d'eau de savon, d'eau salée ou de décoction de tabac, de noyer, d'absinthe ;*
>
> *Par le badigeonnage avec un lait de chaux mélangé d'acide phéniqué ;*
>
> *Par les insufflations de poudres insecticides, poussières de tabac, de feuilles d'absinthe, de têtes de pyrêthre, lancées avec un soufflet identique à celui dont on se sert pour le soufrage des vignes."*

Figure 4 - Extrait de : Les amis du cultivateur, *par E. Deliège, instituteur, paru chez H. Matot à Reims, en 1903 (cité par Grison, 1992).*

Les solutions pulvérisées sur les cultures tuent les insectes mis en contact avec leurs principes actifs (Schepers, 1989). Après les années 40, la lutte chimique connaît de grands succès grâce à l'utilisation du DDT[4] et autres composés organochlorés tel le lindane. Si ces insecticides présentent l'avantage d'être persistants, ils ont par contre l'inconvénient de ne pas agir de façon systémique[5]. La pollution de la biosphère tout entière par les résidus d'organochlorés, aggravée par un phénomène de concentration au sein des chaînes alimentaires amène la FAO à recommander, dès 1969, le retrait des insecticides les plus rémanents. Aujourd'hui les organochlorés sont pour la plupart interdits en Europe et en Amérique du Nord (Riba et Silvy, 1989).

---

4 Propriétés insecticides découvertes en 1938 par le Suisse Paul Muller, prix Nobel en 1939.

5 Terme qualifiant un pesticide capable d'être efficace après pénétration et diffusion à l'intérieur de la plante hôte.

Le développement de pesticides systémiques tels que certains composés organo-phosphorés, offre de nouvelles perspectives dans la lutte contre les aphides et les virus qui leur sont associés. Ces produits diffusent en effet jusque dans le phloème, le compartiment alimentaire des pucerons. Deux autres familles de composés chimiques, les carbamates et les pyréthrènoïdes de synthèse élargissent le spectre d'action des produits phytosanitaires. Les différences de mode d'action de ces produits permettent ainsi d'envisager de les utiliser en alternance pour éviter *a priori* l'éventuelle apparition de phénomènes de résistance des insectes à ces composés (Schepers, 1989).

La lutte chimique apparaît encore aujourd'hui comme le moyen le plus efficace pour l'agriculteur, et le plus rentable pour les industries phytosanitaires dans le contrôle des organismes nuisibles. La productivité d'un nouveau pesticide est généralement très élevée après son introduction sur le marché ou tout au moins l'a été par le passé. Par exemple, l'utilisation du DDT contre le doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), et la cicadelle de la pomme de terre, *Empoasca fabae* (Harris), a produit des bénéfices de 29 francs par franc investi au cours des premières années d'utilisation (Metcalf et Luckman, 1982). Des infestations graves de la plupart des espèces nuisibles peuvent être réduites dans les heures suivant les traitements. Cette action rapide, alliée à la facilité d'utilisation et à la disponibilité des composés chimiques et de la technologie de traitement ou d'application, font de la lutte chimique un outil apprécié des producteurs et facile à prescrire par les conseillers agricoles.

1.3.2. La lutte intégrée : un concept en développement pour lutter contre les ravageurs

Malgré des épandages d'insecticides croissants d'année en année, il faut bien constater que paradoxalement les dommages causés par les ravageurs ne diminuent pas depuis les années 40 ; ils auraient même doublé selon Pimentel (1986). De plus, l'utilisation des pesticides chimiques se traduit par de nombreux effets négatifs : -1) effets sur l'environnement : pollution de l'eau, présence de résidus toxiques dans les aliments, impact sur la santé humaine ; -2) réduction du potentiel biologique, qui se traduit par un nivellement de la diversité génétique des espèces visées, mais aussi des organismes utiles ; -3) sélection génétique de ravageurs suite à une exposition continue aux pesticides (adaptations biochimiques ou comportementales permettant d'annuler leurs effets toxiques) (Gould, 1984 ; Roush et McKenzie, 1987 ; Devonshire, 1989). En 1981, Georghiou dénombre déjà 400 arthropodes manifestant une résistance à une ou plusieurs classes d'insecticides, dont dix-huit espèces de pucerons[6] (annexe 2). Ce problème est particulièrement grave du fait de son expansion et de sa persistance pour trois espèces : *M. persicae, A. gossypii,* et *Phorodon humuli* (Schrank) (Devonshire, 1989).

La lutte chimique semble donc ne pas être la panacée. Parmi les méthodes qui sont explorées depuis cette prise de conscience, les méthodes biologiques sont celles qui offrent le plus de solutions durables et en adéquation avec le respect de l'environnement. De fait, la lutte intégrée (y compris sa composante lutte biologique) est une approche qui semble rallier de plus en plus de producteurs et de scientifiques (pour revue Fraval, 1993).

La **lutte intégrée**[7] se situe à mi-chemin entre la lutte chimique et la lutte biologique. C'est un compromis initié par une école californienne (Stern *et al.*, 1959) en réponse aux abus entraînés par une approche monolithique basée uniquement sur l'utilisation des pesticides. La lutte intégrée n'exclut pas le recours à des pesticides chimiques ; elle en prévoit l'usage, bien maîtrisé, en l'associant à celui de toutes les techniques compatibles avec une saine gestion qui peuvent concourir à une bonne protection des cultures, tout en garantissant le respect des insectes auxiliaires et pollinisateurs. Il n'est plus question d'éliminer les ravageurs jusqu'au

---

6 Encore cette liste ne dénombre-telle que les cas de résistance décrits dans la littérature.

7 IPM (Integrated Pest Management) des anglo-saxons.

dernier, mais d'abaisser leurs effectifs de telle façon que les dégâts soient supportables. La lutte intégrée découle de fait de l'emploi de moyens biologiques de lutte (paragraphe suivant). L'utilisation des variétés résistantes est (ré)apparue comme l'une des composantes majeures de cette approche : introduire dans le génome du végétal une partie des facultés de défense de la culture peut en effet permettre une plus grande souplesse dans l'utilisation globale des moyens de protection (Riba et Silvy, 1989 ; Allen et Rajotte, 1990 ; Quisenberry et Schotzko, 1994 ; Wiseman, 1994).

Dans le cadre précis de la lutte contre les pucerons, la lutte intégrée englobe toutes les techniques et mesures capables d'interrompre le cycle de vie des insectes au cours de l'une ou l'autre de ses phases (Harrewijn, 1989) :

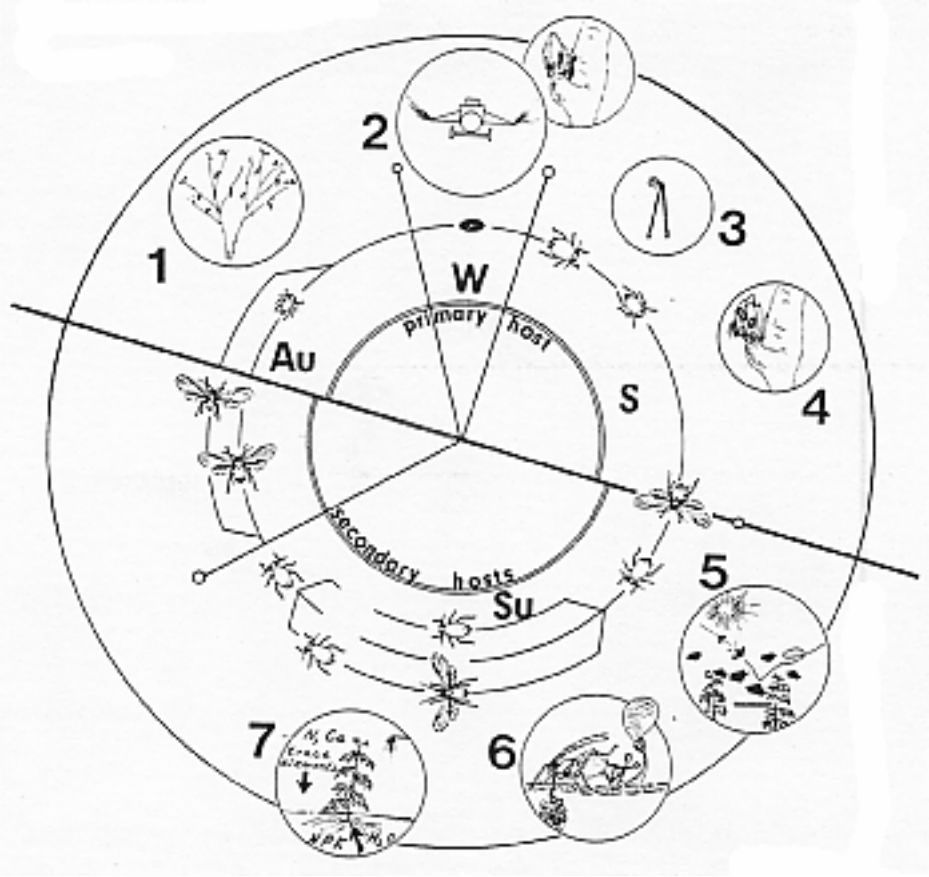


Figure 5 - Exemples de pratiques pouvant être mises en place dans le cadre d'une lutte intégrée contre les pucerons (d'après Harrewijn et Minks, 1989).

***AU** : automne ; **W** : hiver ; **S** : printemps ; **Su** : été*
***1**. Défoliation de l'hôte primaire pour réduire l'oviposition ; **2**. Pulvérisation d'huiles minérales pour tuer les oeufs d'hiver ; **3**. Elagage des hôtes primaires au printemps ; **4**. Application de moyens pour restreindre l'habitat des prédateurs à celui des hôtes primaires ; **5**. Détournement des ailés de leurs plantes cibles ; **6**. Mise en culture de variétés résistantes ; **7**. Interventions pour modifier à bon escient la physiologie de la plante.*

1.3.3. Les solutions biologiques de lutte contre les pucerons

La **lutte biologique** telle qu'elle a été définie en 1971 par l'Organisation Internationale de Lutte Biologique (OILB) peut être considérée, dans son sens le plus strict, comme "l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles". Ce concept fait également référence à toute modification de l'environnement, dans le respect des règles écologiques de stabilité et d'équilibre, qui conduisent au maintien des organismes nuisibles en dessous d'un seuil économique. La grande diversité des ressources biologiques en principe exploitables en lutte

biologique donne lieu à diverses techniques utilisables (Cloutier et Cloutier, 1992). Deux grands types d'interventions sont distinguées :

-1) les interventions visant à exploiter des organismes vivants (antagonistes) ou des produits dérivés d'organismes vivants, dans le but précis d'éliminer les ravageurs ;

-2) les interventions visant à diminuer l'activité des ravageurs, fondées sur l'usage : -a) de substances, comme les phéromones, agissant sur leur comportement ; -b) de cultivars montrant une résistance aux ravageurs ; -c) de substances, comme les juvénoïdes, perturbant leur développement ; -d) de substances chimiostérilisantes ou de mâles stériles. Nous ne détaillerons pas ces deux dernières possibilités d'intervention dans la mesure où elles ne sont pas appliquées pour les pucerons.

1.3.3.1. Antagonistes actuels ou potentiels des pucerons

Chaque espèce animale possède un grand nombre d'antagonistes associés de façon plus ou moins spécifiques, qui sont soit des animaux identifiés alors comme "ennemis naturels", soit des microorganismes pathogènes. Les ennemis naturels des insectes sont des parasitoïdes[8], des prédateurs ou des parasites tels que les vers nématodes (Cloutier et Cloutier, 1992). Nous n'évoquerons pas ces derniers car ils n'interviennent pas dans le cadre de la lutte contre les pucerons. Les microorganismes pathogènes causent des maladies infectieuses et font partie de quatre grands groupes taxonomiques : les virus, les bactéries, les champignons et les protozoaires.

En France, seulement 125 ha de cultures ont été "traités" en 1992 contre les pucerons avec l'un ou l'autre de ces auxiliaires (Maisonneuve, 1993). A l'échelle mondiale, dans tous les cas où la lutte biologique est utilisée avec succès pour combattre les pucerons, les antagonistes sont, à une exception près, des **parasitoïdes** membres de la famille des Aphidiidae (Hymenoptera : Ichneumonidae) comme cela apparaît dans le tableau 1 (Rabasse *et al.*, 1984 ; Stary, 1988b ; Carver, 1989). Les espèces du genre *Aphelinus* (Chalcidoidea) sont en général moins communes en plein champ, même dans leur habitat d'origine, ce qui explique qu'à l'exception d'*Aphelinus mali* Haldeman, l'impact de leur introduction soit faible ou secondaire par rapport à celui des Aphidiidae (Stary, 1988a). Cependant, des résultats prometteurs pour lutter contre *M. persicae* ont été observés en serre avec *Aphelinus asychis* Walker (Ramakers, 1989).

De nombreuses recherches portent sur l'impact de coccinelles (Coleoptera : Coccinellidae) sur les pucerons (Iperti, 1966 ; Frazer, 1988b ; Frazer, 1988a). Mais si diverses espèces de ces **prédateurs** ont été testées avec succès en France, notamment, dans des cultures abritées (Moinet, 1994), ou en extérieur comme pour les expériences de la ville de Caen (DDE-Caen, 1984) leur exploitation commerciale et leur réelle efficacité posent encore des problèmes (Rabasse, 1985 ; Cloutier et Cloutier, 1992; Maisonneuve, 1993). Quoique son usage ne soit pas encore très répandu, l'espèce de cécidomyiide *Aphidoletes aphidimiza* (Rondani) (Diptera : Cecidomyiidae) est offerte sur le marché pour combattre les pucerons en serre dans certaines conditions (Markkula *et al.*, 1979 ; Rabasse, 1985 ; Nijveldt, 1988 ; Cloutier et Cloutier, 1992). D'autres prédateurs mériteraient d'être plus étudiés : les larves de syrphides (Diptera : Syrphidae), par exemple, sont extrêmement voraces et constitueraient d'excellents aphidophages (Chambers, 1988). Des Neuroptères de la famille des Hemerobiidae ou des Chrysopidae se sont également montrés efficaces pour combattre des pucerons tels que *M. persicae* et *A. gossypii*, et pourraient donc être aussi exploités en lutte biologique (Lyon, 1979 ; New, 1988). Sans prétendre être exhaustif, nous avons rassemblé dans le tableau 1 des exemples de prédateurs utilisés en lutte biologique contre les pucerons.

---

8 Les parasitoïdes sont des entomophages intermédiaires entre les parasites et les prédateurs : ils exploitent d'abord leur victime en vrais parasites, puis finissent par la tuer et la consommer dans un acte final s'apparentant à la prédation.

Antagonistes	Mode d'activité	Application	Disponibilité (Europe)	Pucerons visés	Références*
Insectes parasitoïdes					
Hyménoptères aphidiides					
Aphidius matricariae cosmopolite, aphidiide adapté aux cultures sous abri	Endoparasitoïde solitaire	Libération inondative ou inoculative en serre	Commercialisé, élevé en laboratoire ; incidence naturelle	*Myzus persicae*	(1) (2)
Aphidius sp. aphidiides	Endoparasitoïdes solitaires	-	-	*Acyrthosiphon kondoi, A. pisum, Cavariella aegopodii, M. persicae, Hyperomyzus lactucae,* pucerons des céréales	(3) (2)
Dioeretella rapae aphidiide cosmopolite, polyphage	Endoparasitoïde solitaire	Libération inondative ou inoculative en serre	Faune endogène, élevé en laboratoire	*M. persicae*	(1) (2)
Ephredrus cerasicola aphidiide exotique d'Europe	Endoparasitoïde solitaire	Libération inondative ou inoculative en serre et en verger	Elevé en laboratoire (Finlande)	*M. persicae, Brevicoryne brassicae*	(1) (2) (3) (4)
Lysiphlebus testaceipes aphidiide introduit en France	Endoparasitoïde solitaire	Libération inondative	Elevé en masse (France)	*Aphis gossypii*	(1) (2)
Praon sp. aphidiides	-	-	-	*M. persicae, Therioaphis trifolii f. maculata*	(2) (3) (4)
Trioxys sp. aphidiides	-	-	-	*Eucallipterus tiliae, T. trifolii, Tinocallis platani*	(2) (3)
Hyménoptères chalcidiens					
Aphelinus sp. aphelinides spécifiques	Endoparasitoïdes solitaires	Libération inondative ou inoculative	-	*A. pisum, Eriosoma lanigerum, Myzocallis annulatus, Schizaphis graminum, T. trifolii f. maculata*	(2) (3)
Prédateurs polyphages					
Coléoptères coccinellides et autres					
Adalia bipunctata cosmopolite de l'hémisphère Nord	-	Libération inondative en serre	Faune indigène élevée en laboratoire	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1) (5)
Coccinella septempunctata	-	Libération inondative en serre	-	*M. persicae, Macrosiphum euphorbiae, Aulacorthum solani*	(1) (3) (5) (6)
Coccinella undecimpunctata introduit d'Europe en Amérique	-	Libération inondative en serre	Faune indigène élevée en laboratoire	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1) (5)
Cycloneda limbifer exotique de Cuba	-	Libération inondative en serre	Elevée en laboratoire (Europe)	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1 (5)
Propylea quatuordecimpunctata indigène	-	Libération inondative	Elevée en laboratoire (Europe)	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1) (5)
Semiadalia undecimpunctata exotique d'Europe	-	Libération inondative	Elevée en laboratoire	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1) (5)
Diptères					
Aphidoletes aphidimyza cecidomyiide cosmopolite	-	Libération inoculative ou inondative	Commercialisé	*M. persicae, A. fabae, A. gossypii, Aphis pomi, Brachycaudus helichrysi, M. euphorbiae, Phorodon humuli*	(1) (2) (7)

Metasyrphus corollae syrphide exotique d'Europe	-	Libération inondative	Elevée en laboratoire (Europe)	*A. gossypii* et autres pucerons des serres, *Sitobion avenae*	(1) (8)
Episyrphus balteatus syrphide	-	-	-	*A. pomi*	(8)
Neuroptères					
f. Hemerobiidae	-	-	-	*B. brassicae, Aphis sambuci, M. persicae, A. pisum, A. gossypii*	(5)
f. Chrysopidae : *Chrysopa carnea* *C. septempunctata*	-	Libération inondative	Elevées en masse (Europe de l'Est)	*M. persicae , M. euphorbiae, M. rosae, A. gossypii, Megoura viciae, B. brassicae, Aphis nerii*	(1) (5)
Champignons					
- Coelomycètes					
Aschersonia aleyrodis pathogène de cochenilles et pucerons	Mycose mortelle	Biopesticide pour intervention curative ou inoculative	Souches expérimentales		(1)
- Hyphomycètes					
Fusarium lecanii large spectre, souches spécifiques de cochenilles, pucerons et thrips	Libération de toxines; Mycose mortelle	Biopesticide pour intervention curative ou inoculative à caractère épizootique	Formules commerciales (Mycotal™, Vertalec™) et expérimentales	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1) (6) (9)
- Zygomycètes (Entomophtorales)					
Conidiobolus obscurus pathogène de pucerons	Mycose mortelle	Biopesticide pour intervention curative ou inoculative à caractère épizootique	Souches de laboratoire (Europe)	*M. persicae* et autres pucerons des serres	(1) (9)
Erynia neoaphidis pathogène de pucerons	Mycose mortelle	Biopesticide pour intervention curative ou inoculative à caractère épizootique	Souches de laboratoire (Europe)	Pucerons des serres	(1) (9)
Zoophtora radicans introduit en Israël	-	-	-	*T. trifolii f. maculata*, pucerons des serres	(3) (6) (9)
Virus					
Baculovirus à polyédrose ou à granulose	Virose mortelle	Biopesticide pour intervention curative ou inoculative	Formules expérimentales	Pyrale du maïs ou Piéride du chou ; pas de travaux faisant références à des Homoptères	(1)
Bacilles					
Bacillus thuringiensis	β–endotoxine ; spores ; δ–endotoxines	Biopesticide curatif ± rémanent	Formules expérimentales ou marques commerciales	Lépidoptères ; Coléoptères ; Diptères pas de travaux faisant références à des Homoptères	(1)

Tableau 1 - Exemples d'antagonistes potentiellement utilisables pour lutter contre des pucerons.

***** les références données correspondent à des articles de synthèse regroupant les travaux relatifs à chaque couple antagoniste/puceron :
(1) Cloutier & Cloutier, 1992 ; (2) Stary, 1989 ; (3) Hughes, 1989 ; (4) Ramakers, 1989 ; (5) New, 1989 ; (6) Carver, 1989 ;
(7) Nijveldt, 1989 ; (8) Chambers, 1989 ; (9) Latgé et Papierok, 1989.

Des représentants de deux taxons de **champignons entomopathogènes**, les Hyphomycètes et les Zygomycètes sont actuellement considérés comme des biopesticides potentiels contre les pucerons. C'est le cas en particulier de certaines espèces des genres *Verticillium* (=*Fusarium*), *Conidiobolus*, *Entomophtora*, *Erynia*, *Neozygites* et *Zoophthora* (tableau 1). Mais l'efficacité des formules à base de champignons entomophages dans le contexte local de la culture sous abri reste à démontrer, notamment à cause des conditions relativement sèches qui caractérisent la saison hivernale des cultures sous nos latitudes (Rabasse et al., 1984) .

Deux autres antagonistes utilisés en lutte biologique ont retenu notre attention: les virus et les bactéries. Les baculovirus en particulier font l'objet de nombreux travaux. Ils s'attaquent uniquement à des invertébrés de manière très spécifique. Ils ne présentent donc aucun danger pour les mammifères et autres vertébrés et leur emploi permet une intervention précise sans risque d'effets néfastes sur les ennemis naturels du ravageur visé (Cunningham, 1988). Le bacille entomophage le mieux connu en lutte biologique, et le seul qui soit commercialisé et utilisé sur une grande échelle, est le Bacillus thuringiensis. Il accapare environ 90 % du marché actuel des biopesticides (Riba et Silvy, 1993 ; Aronson, 1994). Bien qu'une description plus détaillée de ces antagonistes ne serait pas sans intérêt, nous nous limiterons à cette évocation. Ils apparaissent en effet guère exploitables pour lutter contre les pucerons ; à l'heure actuelle aucune publication n'a fait preuve de leur potentiel d'utilisation pour combattre les Homoptères.

1.3.3.2. Modification du comportement des pucerons

Une autre approche pour lutter biologiquement contre les pucerons est celle qui consiste à modifier certaines phases de leur comportement (figure 5), comme celle du choix de la plante hôte par les ailés (Gibson et Rice, 1989). En effet, les ailés sont attirés ou non vers une plante en fonction de sa couleur ou des substances volatiles qu'elle émet (Kring, 1972). La tactique consiste alors à déposer sur le sol des plaques d'aluminium, des plaques plastiques blanches. Pour les repousser les études sur les substances volatiles (attractives ou répulsives) émises par les plantes ont été longtemps rares sur les pucerons (Herrbach, 1985b) mais sont en net progrès (Nottingham et al., 1991 ; Powell et al., 1995a); Des tentatives d'utilisation en pulvérisation de la phéromone d'alarme des pucerons, le (E)-_-farnésène, sont rapportées mais à long terme les ailés semblent s'habituer à cette odeur (Bowers et al., 1977 ; Montgomery et Nault, 1977 ; Griffiths et Pickett, 1980 ; Müller, 1983 ; Herrbach, 1985a ; Herrbach, 1992). Certains pucerons tel que *M. persicae*, s'y seraient même montrés insensibles. Une autre approche originale consiste à inhiber la réponse des pucerons à la phéromone d'alarme par du (-)-β-caryophyllène. Cet inhibiteur minimise la dispersion des pucerons au moment de l'attaque d'un prédateur multipliant de fait l'efficacité de cet antagoniste et diminuant du même coup les risques d'expansion d'éventuels virus transportés par les pucerons (Roitberg et Myers, 1978).

1.3.3.3. Obtention de plantes résistantes aux pucerons par la sélection variétale classique

Parmi les divers insectes phytophages, peu sont aussi spécialisés que les pucerons dans le choix des plantes hôtes. Ainsi, alors que la plupart des macrolépidoptères sont capables d'attaquer des plantes appartenant à plus d'une famille, 90 % des espèces de pucerons accomplissent leur cycle biologique sur un seul hôte et sont alors inféodés à une seule ou un petit nombre d'espèces végétales étroitement apparentées (Comeau, 1992). Certes, un puceron tel que *M. persicae* est extrêment polyphage[9] (Blackman et Eastop, 1985). Malgré tout, chez plusieurs espèces cultivées, une résistance variétale à cet insecte peut être décelée (Auclair, 1989). La spécificité alimentaire des pucerons facilite en général la tâche de création de

9 *Myzus persicae* s'attaque à plusieurs espèces de *Prunus*, divers arbustes, ainsi que nombre de légumes, dont le céleri, la laitue, la betterave, la tomate, l'aubergine, la pomme de terre, les crucifères, les cucurbitacées, etc.

cultivars résistants car de légers changements biochimiques peuvent donner lieu à l'un des deux types de résistance observables chez une plante :

-1) l'**antixénose**, ou "non préférence", qui correspond à une réaction comportementale de rejet de la plante par l'insecte : un puceron est par exemple repoussé par la couleur, l'odeur ou le goût lors des piqûres exploratoires ;

-2) l'**antibiose**, qui se traduit par des effets négatifs de la plante sur la physiologie de l'insecte (diminution de la croissance, du taux de reproduction) quand il ne reçoit pas l'alimentation précise qui lui convient, ou qu'il subit l'effet négatif de substances secondaires (Russel, 1981).

La tâche du sélectionneur consiste donc à faire s'exprimer dans une variété cultivable l'un ou l'autre de ces types de résistance en y transférant un mécanisme de défense naturelle.

a. Mécanismes de résistance naturelle exploitables par le sélectionneur

Les recherches sur les interactions plantes-pucerons permettent d'envisager une prise en compte des mécanismes de défense mis en jeu contre ces ravageurs dans les stratégies de création de plantes résistantes par sélection variétale.

Certains mécanismes de résistance ressemblent aux mécanismes d'**hypersensibilité** observés dans les cultivars résistant à certains champignons comme les rouilles[10]. L'épinette, *Picea excelsa* Link. réagit ainsi par hypersensibilité nécrotique contre le puceron *Adelges abietis* (Linnaeus) (Comeau, 1992). Le pommier sauvage, *Malus robusta* résiste de la même façon à *Dysaphis plantaginea* (Passerini) (Alston et Briggs, 1970), ainsi que certaines variétés de pêchers à *M. persicae* (Massonie *et al.*, 1984; Rahbé *et al.*, 1988).

Les recherches sur les poils glandulaires ou **trichomes** de *Solanum* sauvages apparentées à la pomme de terre, conduisent à des résultats intéressants pour lutter contre *M. persicae* ou *M. euphorbiae* (Gregory *et al.*, 1986 ; Lapointe et Tingey, 1986 ; Auclair, 1989). Cependant, si les résistances associées à la production de substances collantes et toxiques sont efficaces, elles sont aussi d'origine polygénique (Mehlenbacher *et al.*, 1984). En conséquence, le transfert de ces résistances complexes crée généralement des plantes affligées de caractères agronomiquement indésirables, ce qui nécessite que celui-ci soit suivi de plusieurs rétrocroisements ou d'une sélection récurrente pour créer un cultivar intéressant économiquement.

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des **substances allélochimiques** dans le choix de la plante hôte (Herrbach, 1985b). La littérature fournit des exemples d'allélochimiques intervenant sur :

-1) le comportement d'**épreuve** des pucerons[11] ou le comportement de **pénétration** des stylets, par stimulation ou par inhibition. Ainsi la lutéoline (glycoside de flavone) est phagostimulante pour *Aphis fabae* Scopoli (Jördens-Röttger, 1979) mais anti-appétante pour *S. graminum* (Dreyer et Jones, 1981). Schoonhoven et Derksen-Koppers (1976) démontrent aussi la propriété anti-appétante vis à vis de *M. persicae* de deux glycosides cyanogènes, la dhurrine et l'amygdaline. Le DIMBOA, aglycone d'un glycoside phénolique présent dans le maïs et d'autres céréales a une action létale sur *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), *Metopolophium dirhodum* (Walker) et *S. graminum* qui s'accompagne d'un effet phagodissuadant (Niemeyer, 1988 ; Corcuera, 1990 ; Givovich *et al.*, 1994). Enfin deux

10 La réaction d'hypersensibilité correspond à une réaction précoce du végétal qui conduit à la nécrose très rapide des cellules envahies, et de ce fait à la mort ou à l'isolement du champignon parasite. En l'occurence avec les pucerons, ceci se traduit par une impossibilité de s'alimenter dans le compartiment phloémien.

11 = première évaluation de l'appétence de la plante sur la base de ses caractéristiques de surface par des piqûres de courtes durées.

glucosides ont été très étudiés : la phlorizine (spécifique du genre *Malus*), et la sinigrine (glucoside soufré omniprésent dans la famille des Crucifères). Ils agissent à plusieurs niveaux du comportement de sélection de l'hôte par certaines espèces de pucerons (Montgomery et Arn, 1974 ; Herrbach, 1985b).

-2) le comportement d'**ingestion**. Les sucres (en particulier le saccharose) et les acides aminés sont des exemples typiques d'allélochimiques nutritifs (Rahbé *et al.*, 1992).

Des études récentes montrent aussi qu'un mauvais équilibre nutritif peut ralentir la croissance des pucerons (Febvay *et al.*, 1988a ; Febvay *et al.*, 1988b ; Girousse *et al.*, 1991 ; Girousse et Bournoville, 1994). Il paraît cependant illusoire de chercher à créer une plante dont l'antibiose serait uniquement obtenue par des carences quelconques ou un déséquilibre en acides aminés (Comeau, 1992).

b. Evaluation d'un projet de création de cultivars résistant aux pucerons - Prise en compte du problème de transmission de virus

L'élaboration d'un projet relatif à la production de cultivars résistant aux pucerons peut être résumée :

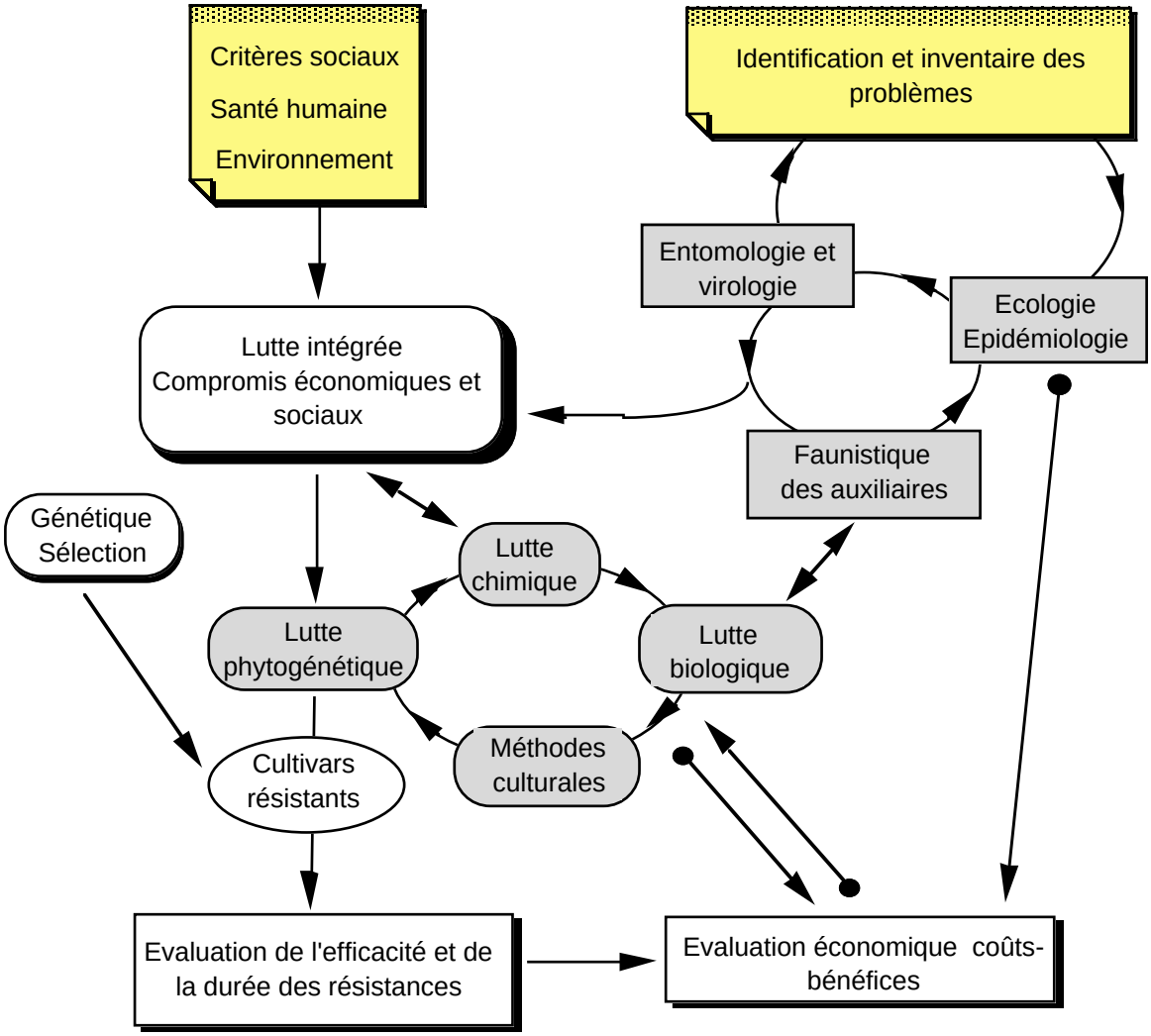


Figure 6 - Intégration globale et évaluation d'un projet de création de cultivars résistants aux pucerons et aux virus qui leur sont associés (d'après Comeau, 1992).

Si le problème de transmission virale par ces insectes a été parfois négligé par les sélectionneurs dans le passé, aujourd'hui les programmes de sélection prennent en compte cette interaction plantes-pucerons-virus. Nous avons signalé précédemment que ces derniers sont en effet les éléments majeurs des dommages causés aux plantes. Outre qu'ils soient responsables de maladies, ils peuvent favoriser la croissance des populations de pucerons et la production d'ailés, conduisant à l'extension des épidémies (pour exemples Comeau, 1992).

La stratégie d'amélioration génétique doit donc viser en premier lieu à identifier correctement les virus associés aux pucerons. Des résultats convaincants résultant de cette démarche ont d'ores et déjà été enregistrés. Par exemple, des chercheurs de l'INRA d'Avignon ont créé une variété de melon résistante à la fois à *A. gossypii* et aux virus qu'il transmet (Pitrat et Lecoq, 1982).

1.3.3.4. Avantages et inconvénients de la sélection variétale pour lutter contre les pucerons

La sélection variétale classique présente des avantages (+) et des inconvénients (-) qui doivent être considérés lors de l'élaboration de programmes de sélection. Certains de ces avantages ou de ces inconvénients sont d'ailleurs partagés avec la création des plantes transgéniques que nous évoquerons dans le paragraphe suivant :

(+) la **réduction du coût** d'application des **traitements**. C'est le plus trivial des avantages pour l'agriculteur. Ces coûts sont bien sûr reportés sur l'investissement initial dans la variété ;

(+/-) le **coût initial** de la production varie selon les espèces, mais il se compte souvent en centaines de milliers de francs (Comeau, 1992). C'est pourquoi la création de cultivars résistant aux pucerons se fait de façon sporadique, même pour les espèces agricoles les plus importantes. Pourtant ce coût est bien **inférieur** à celui de la recherche d'un nouvel **insecticide**. Boulter (1993) estime à 4 ou 5 millions de dollars US le coût de la création d'une nouvelle variété transgénique, alors que l'effort de recherche d'un insecticide s'élève à 22,5 millions de dollars US. L'intérêt porté par les industries phytosanitaires à la sélection variétale dépend donc essentiellement du rapport coût de production/bénéfices. Dans le cas où un cultivar résistant couvre une grande surface, des rapports très attractifs peuvent être obtenus, allant jusqu'à un rapport de 1/300 [12] alors qu'aujourd'hui la production de nouveaux pesticides ne permet qu'un rapport d'environ 1/5 (Comeau, 1992) ;

(-) il existe un **délai** important entre l'initiation d'un projet de création d'un cultivar résistant et l'obtention des bénéfices (figure 6) ;

(+) l'utilisation de cultivars résistants est plus **saine** pour l'agriculteur et pour l'environnement ;

(+) les **aléas**, notamment climatiques, des itinéraires techniques sont **réduits** (pas de lessivage, pas de dégradation par les UV), et la **protection** est théoriquement active **tout au long de la culture**[13]. Aussi chaque insecte ravageur est combattu au stade le plus sensible de la culture (ce stade peut être différent en fonction de l'espèce déprédatrice). Réciproquement, les stades sensibles des ravageurs (en général le stade larvaire) sont constamment visés (Boulter, 1993) ;

(-) cet argument de l'**exposition** permanente du ravageur n'est pas univoque. L'exposition de l'**environnement** est bien plus limitée que dans les traitements insecticides classiques,

---

12 Chaque franc investi engendre 300 francs de bénéfices.

13 Cet avantage l'est surtout en comparaison d'une protection chimique. Il faut noter que cette protection "permanente" n'est pas la règle générale pour les résistances classiques qui peuvent être très dépendantes du stade de développement de la plante.

mais les ravageurs peuvent rester longtemps sur les plantes avant d'être tuer. L'impact de ce type d'exposition reste sujet à discussion dans la mesure où elle dépend de très nombreux facteurs. Nous reviendrons sur ce point quand nous définirons le concept de "gestion de résistance" ;

(+) la **protection** de **tissus difficiles d'accès** par les produits phytosanitaires classiques est effective. Nous verrons dans le cas des plantes transgéniques que ceci suppose parfois de maîtriser l'expression tissu-spécifique ;

(-) de nouveaux biotypes de pucerons se manifestent assez souvent après l'implantation de cultivars résistants créés par croisements intraspécifiques notamment lorsqu'ils concernent des résistances monogéniques. La simplicité des mécanismes actuellement transférés en transgénèse végétale fait également craindre que les plantes transgéniques puissent être sensibles à une réaction populationnelle du ravageur. Mais le dogme "monogénique = facilement contournable à moindre coût pour l'insecte", classiquement accepté, n'est cependant pas généralisable, et la nature des gènes concernés doit influer hautement sur cette possibilité. Nous abordons plus en détail ce problème du contournement de la résistance par les insectes dans un paragraphe ultérieur ;

(+) en sélection variétale classique, dans certains cas favorables, il est possible que l'hybridation interspécifique fournisse des **gènes, ou groupes de gènes, plus durables** qui ont passé l'épreuve des millénaires en conférant à une espèce ou à un genre botanique entier une résistance stable. Mais ceci suppose cependant que ces gènes ne soient pas liés à des caractères agronomiques indésirables, ou que les problèmes cytogénétiques ne soient pas insurmontables.

Certains des inconvénients que nous venons d'évoquer concernant la sélection variétale classique peuvent être en partie surmontés par le recours aux nouvelles méthodes de génie génétique. Notre étude s'insérant précisément dans le cadre de la stratégie "plantes transgéniques", il nous a semblé important de la décrire dans une partie dédiée.

2. Les plantes transgéniques offrent des perspectives prometteuses pour lutter contre les insectes ravageurs

Le génie génétique offre la possibilité d'incorporer des gènes "étrangers" dans le génome de certaines espèces végétales, tel par exemple un gène codant pour une protéine entomotoxique. La transgénèse ouvre ainsi *a priori* d'immenses perspectives d'amélioration des plantes cultivées, entre autres dans le domaine de la protection contre les pathogènes et les ravageurs.

Dans les paragraphes qui suivent nous décrirons dans un premier temps, les avantages que présente cette nouvelle approche de lutte, tout en montrant ses limites, tant au niveau technique qu'au niveau agronomique (problème d'apparition de populations d'insectes résistants). Dans un second temps, nous décrirons les molécules susceptibles d'être exploitées dans une telle stratégie, en définissant au préalable les critères auxquels les protéines doivent répondre pour être considérées comme de bonnes candidates à la transgénèse.

2.1. Avantages et inconvénients présentés par les plantes transgéniques

Certains des avantages des plantes transgéniques ont été évoqués dans le paragraphe précédent consacré aux "cultivars résistants". Mais la transgénèse présente des avantages et inconvénients spécifiques par rapport à l'amélioration génétique traditionnelle (Potrykus, 1991 ; Dale, 1993 ; Deblock, 1993 ; Sciences, 1993 ; Sawahel, 1994) :

(+) le mécanisme de **résistance** est **parfaitement connu**, ce qui est rarement le cas lors de la sélection variétale classique. Outre l'avantage d'une résistance intrinsèquement marquée (utile pour toutes les phases de sélection), il est alors plus facile d'anticiper par des expérimentations les problèmes de spécificité, de contournement de résistance ou de marquage de la virulence. L'expérience dans ce domaine est limitée, mais cependant instructive : bien avant la commercialisation des variétés incorporant un gène de *B. thuringiensis*, le problème des ravageurs résistants a été intégré à la stratégie à défaut d'être résolu (McGaughey et Whalon, 1992). Cette prise de conscience est assez unique dans le domaine, et peu envisageable pour la création variétale classique, où l'investissement cognitif sur les mécanismes de résistance est presque toujours réalisé *a posteriori* ;

(+) la protection de tissus difficiles d'accès par les produits phytosanitaires classiques est effective, pour peu que l'**expression tissu-spécifique** soit maîtrisée. Si à l'heure actuelle les promoteurs utilisés présentent des caractéristiques fonctionnelles assez imprévisibles (Sciences, 1993), les recherches se multiplient pour atteindre plus efficacement des insectes aux modes alimentaires aussi variés que les ravageurs foreurs, piqueurs ou radicicoles (Bevan *et al.*, 1989 ; Liang *et al.*, 1989 ; Riggs *et al.*, 1989 ; Roby *et al.*, 1990 ; Yang et Russell, 1990 ; Bhattacharyya *et al.*, 1993 ; Shi *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994a). Le contrôle de l'expression dans le temps, par des promoteurs inductibles, est l'autre volet où la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires de défense apportera de nouveaux outils à la création variétale (Liang *et al.*, 1989 ; Bajar *et al.*, 1991 ; Ward *et al.*, 1993 ; Marco *et al.*, 1994) ;

(-) nous avons vu précédemment que le **coût** de la création variétale classique peut être assez élevé. Celui de la création d'une plante transgénique l'est d'autant plus qu'une fois sortie du laboratoire, elle doit encore faire l'objet de traitements ultérieurs dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique sur le principe classique des croisements et des sélections afin d'évaluer la transmissibilité du marqueur inséré et de l'introduire dans un génotype élite (Sciences, 1993). **Génie génétique, transgénèse, amélioration génétique et évaluation variétale** sont donc les quatre volets **nécessaires à l'exploitation** de la **transgénèse**. Ceci explique que la technologie d'ensemble soit longue à mettre en oeuvre et onéreuse. Les contraintes réglementaires joueront vraisemblablement un rôle majeur dans l'établissement des coûts de production, comme c'est le cas dans la recherche d'insecticides (Sciences, 1993) ;

(-) le **succès** des techniques de transformation génétique **dépend** encore de l'**espèce végétale** considérée. La technique utilisant les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* pour le transfert indirect d'ADN dans les cellules végétales est essentiellement limitée aux dicotylédones. L'électroporation[14], qui permet de transformer les monocotylédones (dont les céréales à grande importance économique comme le riz et le blé) nécessite de maîtriser la régénération de plantes à partir de protoplastes[15], difficile à mettre en oeuvre chez de nombreuses espèces végétales. La biolistique[16] permet cependant de contourner ce problème dans certains cas comme pour le riz ou le maïs (Cao *et al.*, 1990).

(-) la transgénèse végétale se base sur la **recombinaison illégitime** de **gènes étrangers** (transgènes) introduits artificiellement. De ce fait, chaque transformant exprime le transgène à un niveau extrêmement variable selon le site où il a été inséré dans le génome nucléaire (Deblock, 1993). Une technique telle que la recombinaison homologue[17] permettrait de

---

14 L'électroporation consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à un courant électrique faible et pulsé pour fragiliser la membrane du protoplaste et induire la formation de pores par lesquels les molécules d'ADN peuvent pénétrer.

15 Cellule végétale ou microbienne, non sexuelle, débarrassée de sa paroi.

16 Projection à grande vitesse de billes de tungstène, d'or ou de platine, enrobées d'ADN à travers les parois des cellules.

17 La recombinaison homologue est encore une technique peu performante. Ce phénomène ne se produit que lorsque de longues séquences d'ADN sont strictement homologues entre l'ADN de l'hôte et l'ADN étranger. Lorsque cette technique est appliquée aux cellules somatiques - capables dans un certain nombre de cas de

pallier les difficultés qui sont liées à l'insertion au hasard des transgènes et améliorerait du même coup la reproductibilité de la transgénèse (Sciences, 1993).

(-) les gènes utilisés pour la transgénèse comportent des régions régulatrices (fonctionnelles mais plus ou moins bien définies), une région dite codante comprenant les exons et les introns du gène, ainsi qu'un terminateur de transcription. Par le recours aux techniques de microinjection et de biolistique, le nombre de **copies** des **gènes** transférés est i**mprévisible** et varie généralement de 1 à 100 (Deblock, 1993 ; Sciences, 1993). Ces gènes sont essentiellement organisés en tandems, intégrés dans des endroits apparemment quelconques du génome de l'hôte. L'ensemble de ces **processus** est donc assez **peu contrôlé**, de sorte que l'expression des transgènes est elle-même souvent difficile à évaluer. De plus, les différents éléments qui composent un gène fonctionnent avec des efficacités très variables selon les cas, et de manière plus ou moins spécifique selon le transgène et la cellule hôte (Deblock, 1993 ; Sawahel, 1994). Une recherche à la fois systématique, et au cas par cas, doit donc être conduite afin de pouvoir maîtriser l'expression des transgènes.

(-) enfin, le problème des **risques**, tant réels que potentiels, est une question intrinsèque à la méthodologie puisqu'elle met en oeuvre des moyens spécifiques de transmission de l'information (agents de transfert, vecteurs, marqueurs et gènes eux-mêmes)(Comai, 1993 ; Dale, 1993 ; Sciences, 1993 ; Hull, 1994 ; Jepson *et al.*, 1994 ; Sawahel, 1994). Dès 1982 en Europe, des projets sont initiés pour évaluer la nuisibilité des disséminations par les structures de propagations (pollen, graines) des gènes introduits avec des plantes transgéniques. Ces projets visent aussi à estimer les possibilités de transfert de gènes, soit dans les populations de plantes sauvages, soit inter-espèces dans le cas des microorganismes associés aux plantes. La propagation des transgènes dans toutes les situations étudiées[18] est extrêmement limitée, et les facteurs susceptibles de l'influencer sont de mieux en mieux appréciés (Sciences, 1993).

2.2. Problème du risque d'apparition de populations d'insectes résistantes aux entomotoxines

Le choix de la protéine toxique à faire exprimer dans une plante transgénique doit absolument tenir compte des risques d'apparition de populations d'insectes résistants. Ce problème est apparu particulièrement aigu depuis la découverte de Lépidoptères (Hv, Pi, Px)[19] ou de Coléoptères (Ld)[20] capables de résister à la toxine de *B. thuringiensis* en laboratoire, voire même au champ. Initialement, le problème de l'apparition de résistances à *B. thuringiensis* avait été largement sous-estimé : les risques étaient considérés comme négligeables en partie du fait du mode d'action de ces toxines. Les leçons tirées des observations de ces dernières années sont à l'origine du développement du concept de "gestion de résistance" visant à retarder ou prévenir l'adaptation des ravageurs (McGaughey et Whalon, 1992). Dans le cas qui nous préoccupe concernant l'introduction d'une protéine entomopathogène dans une plante, trois idées de base sont proposées pour maîtriser la pérennité de la résistance :

-1) diversification des modes d'action des toxines utilisées (pour diminuer la probabilité d'apparition d'individus résistants dans la population visée) ;

-2) réduction de la pression de sélection sur les insectes cibles pour chacun des modes d'action (pour limiter l'avantage sélectif conféré par la résistance) ;

---

conduire à la régénération d'un organisme végétal complet - elle permet d'obtenir la substitution d'un gène par un autre dans un organisme entier et non plus la simple addition d'un gène supplémentaire, comme c'est le cas avec les techniques décrites précédemment.

18 Des travaux ont porté sur le tabac, la pomme de terre, le colza, la luzerne, représentant des situations variées de pollinisation, de dispersion des graines, de propagation (Sciences, 1993).

19 *Heliothis virescens* (Fab.), *Plodia interpunctella* (Hbn) et *Plutella xylostella* (L.), respectivement : Noctuelle verdoyante du tabac, Pyrale indienne de la farine, Fausse-teigne des Crucifères.

20 *Leptinotarsa decemlineata* (Say), Doryphore de la pomme de terre.

-3) maintien d'une proportion d'individus sensibles au sein de la population cible (pour diluer le gène de résistance dans la population).

Le tableau 2 donne un aperçu des tactiques envisageables :

Stratégies	*Tactiques*
Stratégie au niveau du gène	- lignée exprimant un seul gène, - lignée exprimant plusieurs gènes issue d'une transformation par une construction multigénique ou chimérique, - lignée exprimant plusieurs gènes issue d'un croisement de lignées exprimant chacune un seul gène (lignée d'addition).
Choix du promoteur	- expression : constitutive, tissu-spécifique, inductible (éliciteur, blessure).
Taux d'expression du gène	- expression à faible dose visant à gérer la croissance et non à éradiquer l'insecte cible, - expression à forte dose, - expressions différentielles.
Stratégie aux champs	- mélange des graines de lignées exprimant des gènes différents, - répartition spatiale (mosaïque, multilignes) de lignées exprimant des gènes différents, - rotation de lignées exprimant des gènes différents, - maintien de plantes refuges : plantes n' exprimant pas de gène entomotoxique, permettant le maintien de populations d'insectes sensibles

Tableau 2 - Tactiques d'utilisation in planta de gènes gouvernant la synthèse de protéines entomotoxiques (d'aprés McGaughey et Whalon, 1992).

Il existe cependant une controverse quant aux tactiques optimales à adopter. Mallet & Porter (1992) estiment que la meilleure approche est l'utilisation conjointe de l'expression tissu-spécifique des molécules entomotoxiques, du mélange de lignées transgéniques et de plantes refuges, et la combinaison de plusieurs gènes codant pour des protéines aux modes d'action différents.

Une utilisation conjointe de *B. thuringiensis* et d'un inhibiteur de protéase est déjà rapportée par MacIntosh et ses collaborateurs (1990). Ces auteurs montrent que l'adjonction d'un inhibiteur de protéase (une serpine) à dose sublétale dans une solution de toxines de *B. thuringiensis* (à elle seule induisant peu de mortalité) augmente le pouvoir pathogène de la toxine. Si le mécanisme de ce phénomène n'est pas encore élucidé, il a néanmoins pu être reproduit *in planta*.

Cet exemple souligne l'intérêt des recherches sur les autres protéines susceptibles d'être utilisées dans une stratégie de création de plantes transgéniques, alors que dans un premier temps, seule la forte activité entomopathogène des toxines de *B. thuringiensis* avait été exploitée.

2.3. Gènes exploitables pour la création de plantes transgéniques résistantes aux insectes ravageurs

La stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux insectes a reposé jusqu'à ce jour sur l'identification de **mécanismes génétiques simples** conférant des résistances à des ravageurs cibles. Le seul mécanisme actuellement exploité est le plus "trivial" d'entre eux, et

Protéines utilisables	Insectes cibles **Coléoptères** *Cm : Callosobruchus maculatus* *Du : Diabrotica undecimpunctata* *Zs : Zabrotes subfasciatus* *Ao : Acanthoscelides obtectus* *Tc : Tribolium castaneum* *Ag : Anthonomus grandis* *Ld : Leptinotarsa decemlineata*	**Lépidoptères** *On : Ostrinia nubilalis* *Hv : Heliothis virescens* *Sl : Spodoptera littoralis* *Ms : Manduca sexta* *Hz : Heliothis zea* *Ha : Heliothis armigera*	**Homoptères** *Ef : Empoasca fabae* *Nl : Nilaparvata lugens* *Nc : Nephotettix cincticeps* *Ap : Acyrthosiphon pisum* *Mp : Myzus persicae* *Ago : Aphis gossypii*	***Tissus cibles mode d'action***	***Références***
Toxines de *B. thuringiensis*					
toxines "Lépido", CryI(A-G) CryII(B-C)		CryIA(c) et CryIE(b) DL50≈0,1µg sur *Sl*		- intestin moyen; déséquilibre du transport ionique;	(1)
toxines mixtes "Lépido" et Diptères, CryIIA	-	CryIC DL50≈1,5 µg sur *Sl* *Btk* CL50≈0,0001% sur *Sl* et 0,004% sur *Hv*	?	- récepteur de CryIA(c) : amino-peptidase-N (*Ms*).	
toxines "Coléo", CryIII(A-D)	CryIII A toxique sur *Ld* (Chrysom.+, Scarab.+, Curcu.-) CL_{50}=20 ng/cm^2 f. sur *Ld* et entre 1-5 sur chrysomèle du peuplier	-	?		(1)
Autres toxines bactériennes		toxicité révélée sur Diptères		- tox. *Bs* cellules intestinales	(1)
Toxines de *Bacillus sphaericus*	-	en particulier *Culex*	?	- cyt : membrane (non sélectivité *in vitro*)	
Toxines cytolytiques (Cyt) de *Bt israelis* (moustiques)	?	?	?	- phospholipides insaturés	
Autres toxines microbiennes					
Cholesterol oxydase (Cox)	toxique sur *Ag* LC_{50}=0,002%	toxique sur *Hv* et *Hz* à 0,01%	non toxique sur *Mp* à 0,002%	- lyse intestinale, micro-villosités détruites	
Inhibiteurs de protéases					
Inhibiteurs de pr. à sérine (serpines)	BBI inactif (5%) sur *Ao* CpTI toxique (mort. larv.) et inhibiteur sur *Cm* (0,5%)	BBI toxique et inhibiteur de croissance à 2% sur *On* CpTi toxique à 1% sur *Hv* STI faiblement inhibiteur.à 0,01% sur *On* et à 0,1% sur *Hz* PI-IIK inhibiteur à 0,35% sur *Ms*	CpTI inactif sur *Ap* à 0,025% BBI inhibiteur de croissance sur *Ap* à 0,025%	- inhibition des protéases à sérine digestives - déséquilibre nutritionnel secondaire (dû à la com-pensation) - autres cibles ?	(1)
BBI (Inh. Bowman-Birk, soja) CpTI (Inh. Bowman-Birk, niébé) STI (Inh. Kunitz -trypsine-, soja) PI -II (Inh. tryps., pomme de terre)					
Inhibiteurs de pr. à cystéine (cystatines)	OCI inhibiteur à 10% sur *Tc* OCI faibl. inhib. à 0,1% sur *Ag*	?	?	- inhibition des protéases à cystéine digestives - effets indirects ?	(1)
OCI (oryzacystatine, riz)					

Lectines					
Lectines à galactosamine PHA - *Phaseolus vulgaris*	PHA, toxique à 5% sur larves de *Cm*. non toxique pour *Zs*. Controverse sur la toxicité de cette lectine.	PHA pas d'effet sur *On* à 2%	PHA, 50% de mortalité sur *Ef* à 1,5%, 27% sur *Nl* à 0,1%. Peu toxique sur pucerons (à < 0,1%)	- liaison de la PHA à l'intestin moyen de *Cm*	(2)
RCA - *Ricinus communis*	RCA, très toxique pour les larves de *Du* (100% mortalité à 2%)	RCA très toxique pour *On* (100% de mortalité à 2%)	?		
Lectines à glucosamine OSA - *Oryza sativa*	OSA toxique sur *Cm*. Effet identique à ceux de WGA	OSA non testée sur les Lépidoptères	OSA, non testée sur homoptères		(2)
WGA - *Triticum vulgaris*	WGA : retard de développement des larves de *Cm* à 1%	WGA Très toxique pour *On* (100% mortalité à C=2%). Pas d'effet sur *Hv*, *Ms* à 1%	WGA 75-80% mortalité pour *Nl*, moins toxique pour *Nc*. Très peu d'effet sur *Ap*		
UDA - *Urtica dioica*	UDA Toxique. Effet identique à ceux de WGA	UDA non testée sur les Lépidoptères	UDA faible réduction de croissance de *Ap* à 0,025%		
Lectines à mannose ConA - *Canavalia ensiformis* (mannose + glucose)	ConA, sans effet sur *Cm* à 1%. Pas d'effet sur *Du* à 2%	ConA, sans d'effet sur *On* à 2%	ConA toxique à dose moyenne (>0,01%) pour cicadelles et pucerons (*Ap*, *Mp*, *Ago*). CL50≈0,015% sur *Ap*.	- liaison de ConA sur portions antérieures de l'intestin moyen (pucerons)	(2)
GNA - *Galanthus nivalis* (mannose)	GNA, LC_{50}=0,9% pour *Cm*	GNA non testée sur les Lépidoptères	GNA toxique à doses moyennes pour *Nl*, *Nc* et *Ap* , moindre effet sur *Mp*.	- hyperactivité sécrétoire lors de l'intoxication aiguë	
PSA - *Pisum sativum* (mannose + glucose)	PSA, sans effet sur *Du* à 1% et 2%. LC_{50}=1,5% pour *Cm*	PSA, pas d'effet sur *On* à C=2%	PSA toxique à forte dose sur *Nl* et *Ap*		
Autres protéines végétales					
Inhibiteurs d'α-amylase (α-AI)	α-AI toxique pour *Cm* à 0.5-1%	α-AI : toxicité non démontrée	α-AI faiblement inhibiteur sur *Ap*	– α-AII : inhibiteur digestif	(2)
Inhibiteurs ribosomaux (RIP)	ricine : CL_{50}≈0,005% (*Cm*, *Ag*)	ricine : non toxique ni inhibitrice à 0,01% sur *Sl* et *Hv*	ricine (RIP) très toxique à 0,025% sur *Ap*	- RIP : ARNr (N-glycosidase + lectine vectrice)	
Lipoxygenase (Lox)	?	Lox : inhibitrice de croissance sur *Hv*	Lox toxique sur *Nl* et *Mp* (CL50<0,05%)	- Lox : effet sur la qualité des protéines; sur les membranes épithéliales ?	

Tableau 3 - Exemples de protéines toxiques utilisables pour la protection des plantes contre des insectes (non exhaustif).

note : les concentrations actives ou létales sont généralement données en % du poids frais de l'aliment, qui est solide pour les coléoptères et lépidoptères (0,1%=1mg/g) et liquide pour les homoptères (0,1%=1mg/ml); les doses létales (DL50) sont données en µg/ animal quand cela a été possible.

(1) pour revue Bonadé Bottino, 1993.
(2) pour revue Gatehouse *et al.*, 1995 ; des références précises sont données dans le texte.

consiste à exprimer un polypeptide toxique dans l'espèce végétale hôte (Hilder *et al.*, 1989 ; Boulter *et al.*, 1990b; Gatehouse *et al.*, 1992 ; Gatehouse *et al.*, 1993). Dans quelques années cependant, il est probable que les nombreux mécanismes de résistance des plantes seront exploités. En effet, des progrès devraient intervenir après caractérisation des enzymes impliquées soit dans les voies de défense du végétal comme celles de métabolites secondaires ubiquistes (Dawson *et al.*, 1989), soit dans les voies contrôlant son équilibre hormonal ou trophique (Barendse et Peeters, 1995).

2.3.1. Les critères de choix d'un gène utilisable en transgénèse

Pour être considérée comme **bonne candidate** une protéine doit répondre à plusieurs **critères** :

- montrer des niveaux de toxicité suffisants dans son environnement final d'utilisation (*in planta*, administration *per os* - tableau 3) ;

- faire preuve de caractéristiques adéquates de spécificité, c'est à dire avoir une toxicité préférentielle pour les cibles et présenter une totale inocuité vis à vis des insectes auxiliaires, de l'homme ou des animaux domestiques susceptibles de consommer un produit direct ou dérivé de la culture transgénique ;

- ne pas subir de modifications post-traductionnelles importantes et être le produit d'un gène cloné, disponible et simple ;

- avoir un mode d'action différent de celui d'autres toxines déjà exploitées pour pallier le risque d'apparition d'une résistance des insectes cibles aux effets toxiques ;

- ne pas risquer d'influer négativement sur la physiologie de la plante.

Les biologistes ont retenu différentes protéines entomotoxiques répondant à ces critères. Elles sont distinguées selon leur origine. Ce sont des molécules provenant de **micro-organismes** (bactéries, virus, champignons), d'**animaux** (scorpions, araignées, acariens) et bien entendu **des plantes elles-mêmes**. Avant de les présenter plus en détail, nous pouvons remarquer que plusieurs arguments concernant soit les modalités de leur expression, soit leur adaptation à la fonction de défense, confèrent certains avantages aux gènes d'origine végétale :

-1) il est probable que les difficultés d'expression soient toujours plus fortes lorsque le gène n'est pas d'origine végétale, ou tout au moins eucaryote (c'est ce qui se produit par exemple pour les toxines de *B. thuringiensis* où des gènes synthétiques sont nécessaires à leur expression correcte dans un contexte végétal). Le coût phénotypique[21] de la transformation risque d'être également plus important que dans le cas de l'expression de gènes d'origine végétale ;

-2) les toxines d'origine végétale peuvent être considérées comme des gènes naturels de défense des plantes contre les insectes. A cet égard, elles sont donc *a priori* plus à même de servir pour cette fonction ayant déjà été partiellement sélectionnées pour cela au cours de l'évolution ;

-3) en liaison avec l'argument précédent, l'acceptabilité par le consommateur de telles plantes transgéniques est vraisemblablement meilleure. Dans un contexte d'interrogation sur les "manipulations génétiques", ceci est un argument non négligeable (discussion finale).

---

21 Effets négatifs sur les performances agronomiques de la plante transformée. *A priori*, les biologistes moléculaires les considèrent comme négligeables, mais à l'heure actuelle peu de travaux ont été publiés confirmant ce point de vue (Hilder et Gatehouse, 1991).

2.3.2. Les gènes d'origine microbienne ou animale utilisables en transgénèse

La première toxine entomophathogène utilisée en transgénèse est "la" **toxine de *B. thuringiensis*.** Depuis 1983, date à laquelle Barton et Brill proposent l'insertion du gène de la δ-endotoxine dans les chromosomes d'une plante (Landry, 1992), de nombreuses équipes rapportent le transfert de gènes de toxines spécifiques aux Lépidoptères dans les chromosomes du ***tabac*** (Barton *et al.*, 1987 ; Vaeck *et al.*, 1987), de la ***tomate*** (Fischhoff *et al.*, 1987 ; Delannay *et al.*, 1989 ; Van der Salm *et al.*, 1994), du ***coton*** (Perlak *et al.*, 1990), du ***peuplier*** (McCown *et al.*, 1991 ; Jouanin *et al.*, 1993), de la ***pomme de terre*** (Cheng *et al.*, 1992) et du ***maïs*** (Koziel *et al.*, 1993) :

Gènes utilisés	***Plante - Insecte*** Espèce végétale - Ordre (espèce) [Coléoptères, Lépidoptères, Homoptères]	Test labo	Test serre, champ	***Equipe, année***
Toxines de *Bacillus thuringiensis*				
CryIA (a & b)	Tabac - Lep. (*Ms*)	expression faible, protection forte	non	Vaeck, van Montagu *et al.*, 1987 - PGS Barton *et al.*, 1987
	(*Hv*, *Ms*)		non bonne protection	(1) USDA, 1993, Warren *et al.*
CryIA (b & c) modifié	Coton - Lep. (*Hv*)	bonne expression, protection forte protection élevée	oui	Perlak *et al.*, 1990 - Monsanto (2) Jenkins *et al.*, 1991-1993
CryIA (b)	Maïs - Lep. (*On*)		bonne protection	Koziel *et al.*, 1993
	Colza - ?		?	(1) USDA, 1993
	Riz - Lep. (?)		oui	(1) USDA, 1993
CryIA(b)	Tomate - Lep. (*Ms*, *Hz*, *Ha*, *Kl*)	protection forte à moyenne	non non oui	Fischoff *et al.*, 1987 Delannay *et al.*, 1989 (1) USDA, 1993
	Noyer - Lep. ()		?	(1) USDA, 1993
B.t.k.	Pomme de terre - Lep. (*Ms*)		non	Cheng *et al.*, 1992
CryIIIA	Pomme de terre - Col. (*Ld*)		très bonne protection	Perlak *et al.*, 1993 - Monsanto
CryIA(a) modifié	Peuplier - Lep. (*Md*, *Ld*)	protection forte à moyenne	non	(2) McCown *et al.*, 1991
Lectines				
PSA (lectine de pois)	Tabac - Lep. (*Hv*)	protection moyenne à faible		Boulter, Gatehouse *et al.*, 1990
GNA (lectine de perce-neige)	Tabac - Hom. (*Mp*)	protection moyenne	non	Hilder, Gatehouse *et al.*, 1994 - Axis
lectine (?)	Luzerne - ?		oui	(1) USDA, 1993
Inhibiteurs de protéase				
CpTI (serpine de niébé)	Tabac - Lep. (*Hv*)	bonne expression,	non	Hilder, Gatehouse *et al.*, 1987
OCI (oryzacystatine I de riz)	Peuplier - Col. (*Cp*)	protec. signif.	non	Leplé, Jouanin *et al.*, 1995
OCI	Tabac - Col. (??)	oui	non	Masoud *et al.*, 1993
TI/PI (serpines de tomate et pdt)	Tabac - Lep (*Ms*)	oui	non	Johnson *et al.*, 1989
Autres gènes				
I_5A (neurotoxine de scorpion)	Tabac - Lep. (*Hv*)	négatif (pas d'activité)	non	Pang. *et al.*, 1992
α-AI (Inh. α-amylase de haricot)	Pois - Col. (*Cm*)	bonne protection	non	Shade, Chrispeels *et al.* 1994

Tableau 4 - Exemples de plantes transgéniques produites pour la résistance à des insectes (non exhaustif).

abréviations d'insectes: Coléoptères: *Du: Diabrotica undecimpunctata, Ag: Anthonomus grandis*, Cp: *Chrysomela populi* - Lépidoptères: *On: Ostrinia nubilalis, Hv: Heliothis virescens, Sl: Spodoptera littoralis, Ms: Manduca sexta, Hz: Heliothis zea, Ha: Heliothis armigera, Kl: Keiferia lycopersicella, Md : Malacosoma disstria, Ld: Lymantria dispar* Homoptères: *Mp: Myzus persicae.*

(1) référence USDA, 1993: Record of environmental release permits to February 1993, USDA, APHIS, Biotechnology permit unit, 6505 Belcrest road, Hyattsville, Maryland.

(2) cité par Dale *et al.* (1993).

L'effort de criblage réalisé sur l'espèce *B. thuringiensis*, ainsi que sur des espèces voisines comme *Bacillus sphaericus* permettent d'élargir les spectres d'hôtes des endotoxines bactériennes (nombreux Lépidoptères, Diptères d'intérêt médical, certains Coléoptères - tableau 3). Certains ordres d'insectes sont encore "'indemnes", principalement faute de tests adaptés ou puissants de criblage. Chez les Homoptères, à notre connaissance, ces protéines à très haute toxicité moléculaire ne sont pas encore disponibles.

Des tentatives de criblage systématique de **polypeptides** d'origine **fongique** sont également décrites, et aboutissent par exemple à l'identification, et plus récemment au clonage d'une cholestérol oxydase toxique pour un charançon, *Anthonomus grandis grandis* Boheman[22] (Purcell *et al.*, 1993).

Quant aux gènes d'origine animale, leur potentiel ne provient pas de criblage mais de tentatives isolées de valorisation de travaux toxicologiques : plusieurs travaux mentionnent l'utilisation de **venins d'arthropodes** (scorpion, araignées ou acariens prédateurs) contenant des neurotoxines spécifiques des insectes (Habermann, 1972 ; Krasnoperov *et al.*, 1990b ; Krasnoperov *et al.*, 1990a ; Piek, 1990; Usherwood et Blagbrough, 1991). Ces mentions ne concernent cependant qu'exceptionnellement les plantes transgéniques (Pang *et al.*, 1992). En fait, si ces toxines ne présentent généralement pas d'activité par ingestion, leur présence dans des produits destinés à l'alimentation pose cependant des problèmes particuliers d'acceptabilité par les consommateurs (Nentwig, 1993). Certains venins expriment également des activités hydrolytiques qui se sont avérées très toxiques chez certains insectes testés[23], mais leur probable phytotoxicité ne semble pas leur promettre un avenir dans le domaine qui nous intéresse.

2.3.3. Les gènes d'origine végétale utilisables en transgénèse

Ces dernières années, quelques toxines végétales ont été étudiées telles que les **RIP** (Protéines Inhibitrices de Ribosomes) ou d'autres inhibiteurs enzymatiques (Gatehouse *et al.*, 1990b ; Ferrari *et al.*, 1991 ; Barbieri *et al.*, 1993 ; Strittmatter et Wegener, 1993). Mais les RIP sont des toxines trop générales pour envisager une large utilisation en transgénèse. Purcell et al. (1994) montrent aussi que certaines enzymes du métabolisme glucidique perturbent l'alimentation des pucerons. Une autre enzyme, la lipoxygénase de pois, se révèle toxique pour un autre homoptère, le delphacide du riz (*Nilaparvata lugens* Stal.). Cette enzyme pourrait avoir pour cible des composantes membranaires de l'épithélium intestinal (Powell *et al.*, 1993).

Mais les travaux sur les protéines d'origine végétale restent encore limités à deux grandes classes de protéines végétales, les **inhibiteurs de protéases** et les **lectines**. L'intérêt pour ces molécules s'explique, du fait que, comme les toxines de *B. thuringiensis*, elles existent sous la forme de larges familles multigéniques très diversifiées qui ont probablement co-évolué avec les principales familles de ravageurs, et renferment en leur sein des variabilités intéressantes. Elles ont en commun d'être des classes de protéines très anciennes, aux fonctions vraisemblablement centrées sur la régulation du développement (inhibiteurs de protéases) ou les phénomènes de reconnaissance cellulaire (lectines). Nous décrivons dans les lignes qui suivent les inhibiteurs de protéases. Quant aux lectines, compte tenu de leur importance dans notre étude, nous y consacrons un sous-chapitre complet.

Les protéases se répartissent en quatre classes fonctionnelles suivant leur mécanisme réactionnel et le type de résidu présent à leur site actif : protéases à sérine, à cystéine, métallo-protéases et aspartyl-protéases. A chacune de celles-ci correspond une classe d'inhibiteurs de protéases (IP) très spécifique (Ryan, 1981 ; Norton, 1991). Les endoprotéases digestives mises en évidence chez les insectes phytophages sont presque exclusivement des protéases à

---

22 Anthonome du coton.

23 Phospholipases et surtout protéases très toxiques vis-à-vis des pucerons par exemple (Rahbé et Febvay, 1993).

cystéine ou à sérine. Les inhibiteurs respectifs de celles-ci, les **cystatines** et les **serpines** sont majoritairement mises en évidence chez les plantes. Ceci explique que les travaux visant à tester l'efficacité d'IP pour protéger les plantes de l'attaque des insectes ravageurs aient principalement fait appel à des gènes d'origine végétale de ces deux classes (Broadway *et al.*, 1986 ; Gatehouse *et al.*, 1991a ; Gatehouse *et al.*, 1992 ; Bonadé Bottino, 1993; Hilder *et al.*, 1993).

Les IP végétaux sont de petites protéines comptant une centaine d'acides aminés. Les serpines sont les mieux connues et sont réparties en sept familles suivant des homologies de séquences : 1. inhibiteur de trypsine du soja (Kunitz), 2. Bowman-Birk, 3. inhibiteurs de trypsine de l'orge, 4. inhibiteurs de la pomme de terre I (PI-I), 5. inhibiteurs de la pomme de terre II (PI-II), 6. inhibiteurs des cucurbitacées, 7. inhibiteurs bi-fonctionnels de maïs (Ragi I-2). En revanche les cystatines sont regroupées dans une seule famille qui sera sans doute appelée à être subdivisée lorsque de nouvelles séquences auront été isolées.

Les IP ont pour cible primaire les protéases digestives des insectes, et se comportent comme des analogues de substrat : une fois reconnus par les protéases, ils forment avec elles des complexes non-convalents stables empêchant leur dissociation ultérieure et la libération de l'enzyme (Bode et Huber, 1992). L'effet délétère des IP a été principalement étudié avec des serpines sur des larves de lépidoptères, aussi bien sur milieux artificiels (Broadway *et al.*, 1986 ; Larocque et Houseman, 1990) que sur plantes transgéniques (Hilder *et al.*, 1987 ; Johnson *et al.*, 1989 ; Boulter *et al.*, 1990a). Certaines études portent également sur des orthoptères (Gatehouse *et al.*, 1992 ; Burgess *et al.*, 1994) et des coléoptères (Gatehouse et Boulter, 1983 ; Hines *et al.*, 1990). Des tabacs et des peupliers exprimant une cystatine présentent aussi une résistance intéressante à ces derniers (tableau 4 ; Masoud *et al.*, 1993 ; Leplé *et al.*, 1995).

Contrairement aux toxines de *B. thuringiensis*, le problème de l'apparition éventuelle de populations d'insectes résistants aux IP, quel que soit l'ordre d'insecte considéré, n'a pas encore fait l'objet de travaux spécifiques. Il est donc actuellement difficile de juger de la pérennité d'une stratégie de défense basée uniquement sur des inhibiteurs de protéases. Ceux-ci présentent néanmoins un potentiel important pour cette stratégie, et la marche à suivre pour mettre en place de tels programmes est à présent relativement bien documentée (Boulter, 1993).

En ce qui concerne précisément les **Homoptères**, bien qu'il soit encore trop tôt pour affirmer que les IP puissent être exploités pour les combattre, des résultats intéressants sont déjà rapportés. Ainsi Rahbé *et al.* (1993) observent des inhibitions significatives de croissance sur milieu artificiel avec *A. pisum* pour des concentrations en IP de 250 $\mu g.ml^{-1}$. Nous pouvons cependant noter que ces auteurs confirment l'absence d'endoprotéase à sérine chez ce puceron[24] (Rahbé *et al.*, 1995) comme cela avait été mentionné auparavant (Srivastava et Auclair, 1963, 1987). Ces résultats, en contradiction avec le mode d'action des IP décrit précédemment, pourraient s'expliquer par une action de ces molécules sur des cibles extra-digestives qu'elles atteindraient en traversant la barrière de l'épithélium intestinal (Rahbé et Febvay, 1993). En effet, de tels transports trans-épithéliaux de protéines ont déjà été observés chez les mammifères (Billings *et al.*, 1991) et les insectes (Allingham *et al.*, 1992). La compréhension du mode d'action des IP n'est donc pas encore complète, au moins en ce qui concerne leur mode d'action chez les Homoptères. Des travaux devront être initiés dans ce sens pour exploiter ces molécules dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons.

---

[24] Ceci correspondrait à une adaptation des pucerons à une alimentation à faible teneur en protéine. La concentration en protéines dans la sève phloémienne des plantes est de l'ordre de 0,2 à 2 $mg.ml^{-1}$, excepté chez les Cucurbitacées où elle peut être 50 fois plus élevée (≈100 $mg.ml^{-1}$) (Fisher *et al.*, 1992).

3. Les lectines végétales sont des candidates intéressantes pour la transgénèse visant la protection des plantes

Après un bref historique sur les découvertes se rapportant aux lectines et leur définition générale, nous présentons certaines des propriétés biologiques des lectines végétales permettant de mieux comprendre les fonctions qui leur sont attribuées. Nous terminons enfin cette présentation des lectines par une revue détaillée de tous les travaux se rapportant à leurs propriétés insecticides et/ou faisant référence à leur potentiel d'utilisation dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes à des insectes (principalement Coléoptères et Lépidoptères).

3.1. Histoire de la découverte des lectines - Définition générale

Il faut remonter aux années 1888 et 1889, pour que Stillmark décrive pour la première fois les propriétés d'agglutination d'une lectine[25]. A partir d'extraits de graines de ricin (*Ricinus communis* L.), cet auteur obtient une préparation de protéines partiellement purifiées qui **agglutinent** les globules rouges du sang. D'autres protéines végétales présentant les mêmes caractéristiques sont découvertes par la suite: la crotine (*Croton tiglium* L.), l'abrine (*Abrus precatorius* L.) et la robine (*Robinia pseudoacacia* L.). En 1898, Elfstrand utilise le terme d'"haemagglutinine" pour désigner ces molécules. La toxicité de l'abrine et de la ricine[26] attirent l'attention de Paul Ehrlich, le père de l'immunologie, qui démontre que les hémagglutinines présentent aussi la propriété d'être **antigéniques.** C'est d'ailleurs par des expériences avec ces deux molécules qu'Ehrlich établit certains des concepts fondamentaux de l'immunologie. En 1902, Landsteiner démontre la **réversibilité** de l'interaction entre la ricine ou l'abrine et les érythrocytes.

Quelques années plus tard, en 1908, Landsteiner et Raubitschek mettent en évidence que toutes les hémagglutinines ne sont pas nécessairement aussi toxiques que la ricine ou l'abrine. Par exemple, les agglutinines isolées du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.), du pois (*Pisum sativum* L.) ou de la lentille (*Lens culinaris* Medick.) sont des protéines solubles dans l'eau et relativement peu toxiques. Nous savons aujourd'hui qu'il est possible de trouver de telles protéines hémagglutinantes dans les **végétaux supérieurs de tout groupe taxonomique**.

Les recherches sur la Concanavaline A de la légumineuse tropicale, *Canavalia ensiformis* sont initiées en 1916 par Jones et Johns. Trois ans plus tard, Sumner réussit à obtenir la forme cristallisée de cette protéine. Il faut cependant attendre 1936 pour avoir une description détaillée de ses propriétés hémagglutinantes et de sa capacité à précipiter les polysaccharides (Sumner et Howell, 1936 cités par Kocourek, 1986). Sur la base de leurs observations, ces auteurs émettent les premiers l'hypothèse que l'agglutination résulte de la réaction de la lectine avec les sucres de la surface des hématies.

L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donné (système A.B.O) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes (Renkonnen, 1948 ; Boyd et Reguera, 1949 cités par Pusztai, 1991). Cette découverte amène Boyd à remplacer le terme d'hémagglutinine par celui de **lectine** (du latin, *legere*: choisir - préférer)

---

25 Cet historique est un bref résumé des synthèses de Kocourek (1986) et Pusztai (1991) ; des références plus précises concernant un point particulier de notre propos pourront donc être retrouvées dans ces revues.

26 En 1982 les termes abrine et ricine furent à nouveau précisés : "abrine" désigne la toxine d'*Abrus precatorius*, la protéine agglutinante de cette plante étant appelée "agglutinine d'*Abrus precatorius*" ; de même pour *Ricinus communis*, le terme "ricine" s'applique en fait à la cytotoxine. Jusqu'à cette date, "ricine" et "abrine" désignaient des préparations contenant et la toxine et l'agglutinine, d'où une certaine ambiguïté lorsqu'on se réfère à la littérature antérieure à 1982 (Kocourek, 1986).

pour mettre en avant la propriété de ces molécules à sélectionner spécifiquement les cellules sanguines.

Du fait des découvertes relatives à la structure chimique des glycoconjugués des différents groupes sanguins, l'implication des sucres dans les réactions d'agglutination est rapidement soupçonnée. Après l'hypothèse émise par Sumner et Howell en 1936, il faut ainsi attendre 16 ans pour que Watkins et Morgan établissent les fondements de la théorie relative à la spécificité osidique de l'inhibition de la réaction d'hémagglutination. La multiplication des découvertes sur les lectines isolées aussi bien de tissus de végétaux supérieurs que de champignons mais également à partir d'animaux, d'invertébrés, de bactéries et de virus, conduit les chimistes à rechercher une définition précise pour les caractériser. Goldstein *et al.* (1980) les définissent comme des protéines d'origine non-immune qui se lient aux glucides, agglutinent les cellules ou précipitent les polysaccharides ou les glycoconjugués. Cette définition a été adoptée par le Comité de Nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie (Dixon, 1981).

Elle implique que les **lectines sont multivalentes,** c'est à dire qu'elles possèdent **au moins deux sites de fixation** aux sucres leur permettant d'agglutiner les cellules végétales ou animales, de précipiter les polysaccharides, les glycoprotéines, les peptidoglycanes ou les glycolipides. Le terme "origine non-immune" permet de distinguer les lectines des anticorps anti-sucres qui peuvent agglutiner des cellules. De plus, de nombreuses lectines sont trouvées chez les plantes et les bactéries qui ne synthétisent pas d'immunoglobulines. Il faut encore ajouter que contrairement aux anticorps qui ont une structure moléculaire commune, les lectines présentent des structures très diverses. Elles diffèrent notamment beaucoup par leur masse moléculaire, leur composition en acides aminés et leur structure bidimensionnelle. De ce point de vue, les lectines s'apparenteraient d'avantage à des enzymes.

Le fait d'inclure dans la définition la caractéristique de posséder au moins deux sites de fixation osidique permet d'exclure de la classe des lectines de nombreuses protéines se liant à des sucres, telles des enzymes spécifiques pour des sucres (glycosidases, glycosyltransférases, etc.), des hormones, des toxines bactériennes ou des interférons (Liener *et al.*, 1986).

L'un des aspects les plus controversés de la définition de Goldstein et de ses collaborateurs est que, si elle est interprétée *sensus stricto*, elle exclut certaines toxines végétales telles que la ricine, l'abrine et la modeccine. Ces protéines proviennent de plantes dans lesquelles des lectines répondant aux critères de la définition sont également mises en évidence (voir note n°26). Ces toxines présentent de fortes homologies (composition en acides aminés, structure primaire) avec les lectines correspondantes, mais leur très faible capacité d'agglutination suggère qu'elles ne possèdent pas de sites multiples de fixation aux sucres. Des travaux récents révèlent également que certaines lectines contiennent "d'autres" types de sites de fixation permettant leur liaison avec des ligands de nature non osidique (Barondes, 1988) ; la restriction, dans la définition du terme de lectine à une liaison spécifique sucre-protéine semble ainsi perdre de sa généralité. Dès lors, bien que la définition générale de lectines de Kocourek et Horejsi ne soit pas totalement universelle, nous l'adopterons pour définir les lectines qui ont fait l'objet de nos travaux : **les lectines sont des protéines (ou des glycoprotéines) d'origine non-immune capables de reconnaître spécifiquement les sucres terminaux de glycoprotéines et d'autres glycoconjugués, et de s'y lier avec une haute affinité de manière réversible sans altérer la structure covalente d'aucun des résidus (ligands) glycosyl reconnus** (Kocourek et Horejsi, 1983 cités par Pusztai, 1991).

3.2. Propriétés générales des lectines

Dans cette présentation des propriétés des lectines nous nous sommes restreints à leurs propriétés générales concernant leurs caractéristiques physico-chimiques, leurs spécificités osidiques à la base de leur classification, et leurs propriétés biologiques. La nature des interactions sucres-lectines est abordée en introduction d'un chapitre ultérieur lorsque nous

Abrév.	Origine végétale		Caractérist				Références
	Nom commun francais / *anglais*	*Nom latin* / famille végétale	*Nbre de sous-unités*	*Poids molé Polymère*	*Polypeptide*	*Nbre de sites de liaison aux sucres par s/unité*	
ASA-I -II	Ail garlic	*Allium sativum* L. Liliacées	2	24	I=11,5 II=12,5	2 ?	(1) Kaku *et al.*, 1992 (2) Van Damme *et al.*, 1992
ConA	Canavalia jack bean	*Canavalia ensiformis* [L.] D Fabacées	4	106	26,5	1	(3) Goldstein et Poretz, 1986 (4) Wang *et al.*, 1971
CPA	Pois-chiche chick pea	*Cicer arietinum* L. Fabacées	?	?	?		Kolberg *et al.*, 1983 cités par (3)
GNA	Perce-neige snowdrop	*Galanthus nivalis* L. Amaryllidacées	4	50	13	1 ?	(5) Van damme et al, 1987, 1988, 1991
LcH-A -B	Lentille lentil	*Lens culinaris* Medick. Fabacées	4 = 2α + 2β	46	α=5,7 ; β=17,5		(3) p70 ; (6) Foriers *et al.*, 1981
NPA	Jonquille daffodil	*Narcissus pseudo-narcissu* Amaryllidacées	3	37,5	12,5	1 ?	(7) Van Damme et al, 1995
PSA	Pois commun garden pea	*Pisum sativum* L. Fabacées	4 = 2α + 2β	50	α=5,8 ; β=17		(3) p75 ; (8) Higgins *et al.*, 1983 ; (9) Pusztai, 1991
VFA = favine	Fève broad bean	*Vicia faba* L. Fabacées	4 = 2α + 2β	52,5	α=5,6 ; β=20,7		(3) p80 ; Hopp *et al.*, 1982 et Horstman *et al.*, 1978 cités par (3)
VVAm	Vesce hairy vetch	*Vicia villosa* Roth Fabacées	?	?	≈ 15 - 18		(10) EY Laboratories - P.O. Box 1787, San Mateo, CA 94401
GSA II	-	*Griffonia simplicifolia* (Wel Caesalpiniacées	4	113	30		(3) p91 ; (11) Iyer *et al.*, 1976
WGA	Blé commun wheat germ	*Triticum vulgare* Vill. Poacées	2	43,2	21,6	2	(3) p103 ; (12) Allen *et al.*, 1973 ; (13) Wright, 1984 ; (14) Raikhel *et al.*, 1993
UEA II	Ajonc d'Europe gorse	*Ulex europaeus* L. Fabacées	4	105	≈ 23 - 25		(3) p115 ; (15) Pereira *et al.*, 1979
UDA	Ortie dioïque stinging nettle	*Urtica dioica* L. Urticacées	1		8-9	2	(16) Peumans *et al.*, 1984
ACA	Amaranthe	*Amaranthus caudatus* L. Amaranthacées	2	66-70	35		(17) Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010
PNA	Arachide peanut	*Arachis hypogaea* L. Fabacées	4	98-110	≈ 24,5 - 28		(3) p163 ; Lotan *et al.*, 1975 cités par (3) ; (18) Naberjee *et al.*, 1993
Jacaline	Jaquier jack fruit	*Artocarpus integrifolia* Lam Moracées	4	40	10		(10) ; (18)
BDA	Bryone dioïque white bryony	*Bryonia dioica* Jacq. Cucurbitacées	2	61	≈ 30 - 32		(10) ; (19) Peumans *et al.*, 1987 ; (20) Barbieri *et al.*, 1993

CSA	Genêt-à-balais scotch broom	*Cytisus scoparius* Link. Fabacées	?	?	31	(10) ; Young *et al.*, 1984 cités par (10)
ECA	Flamboyant corail tree	*Erythrina cristagalli* L. Fabacées	2	56 -68	≈ 28 - 30	(3) p160
SBA	Soja soybean	*Glycine max* [L.] Merr. Fabacées	4	120	30	(3) p151 (21) Lotan *et al.*, 1974 & 1975
PCA	Haricot d'Espagne runner bean	*Phaseolus coccineus* L. Fabacées	4	112	≈ 30	(3) p177 ; (22) Novakova & Kocourek, 1974
LBA	Haricot de Lima lima bean	*Phaseolus lunatus* L. Fabacées	2	60	30	(3) p120
PHA	Haricot commun black kidney bean	*Phaseolus vulgaris* L. Fabacées	4 = L_4, L_3E, L_2E_2 , LE_3 ou L_4	≈ 115	L ≈ 31 E ≈ 35	(3) p173 ; (23) Pusztai & Stewart, 1978
SNA	Sureau noir elderberry	*Sambucus nigra* L. Lonicéracées	2	?	120- 140	(3) p64 ; (26) Broekaert *et al.*, 1984 ; (27) Nsimba *et al.*, 1986
SJA	Sophora japanese pagoda tree	*Sophora japonica* L. Fabacées	4 ?	65 - 133	40 - 65	(3) p145 ; (28) Poretz *et al.* 1974 ; (29) Hankins *et al.*, 1988 ; (30) Ueno *et al.*, 1991 ;
TKA	- china gourd	*Trichosanthes kirilowii* Max Cucurbitacées	2	56	≈ 26 - 30	(18) ; (20) ; (31) Dong *et al.*, 1993
TL	Tulipe tulip	*Tulipa* sp. Liliacées	2 ou 4	60 120	28	(10)
VVA	Vesce hairy vetch	*Vicia villosa* Roth Fabacées	4 = A_4 ou A_2B_2 ou B_4	140 (?)	A = 35,9 B = 33,6	(3) p137 ; Tollefsen et Kornfeld, 1983 cités par (3) et (17) ; (32) Shen *et al.*, 1993
UEA I	Ajonc d'Europe gorse	*Ulex europaeus* L. Fabacées	2	60 - 68	A ≈ 31 B ≈ 32	(3) p201 ; (18) (33) Horejsi et Kocourek, 1974
MAA-I -II	Maackia maackia	*Maackia amurensis* Koch Fabacées	I : 2 II : 4	75 140	38 - 40 34 - 36	(17) ; (34) Konami *et al.*, 1994
RPA	Robinier Faux-Acacia black locust	*Robinia pseudacacia* L. Fabacées	?	≈ 140	25 - 50	(10) ; (35) Horejsi *et al.*, 1978 ; (36) Tazaki *et al.*, 1992

Tableau 5 - Origines et caractéristiques moléculaires des lectines végétales testées sur les pucerons.
(classification identique à celle du tableau 6)

présentons le mode d'action des lectines à mannose/glucose (chapitre 4). Vu le contexte de notre étude, nous nous attachons plus particulièrement sur les fonctions connues ou hypothétiques des lectines dans les plantes.

3.2.1. Les caractéristiques physico-chimiques des lectines

De nombreuses lectines purifiées à ce jour comprennent des sucres liés de façon covalente à la chaîne polypeptidique, et sont de ce fait des glycoprotéines (Pusztai, 1991). Ce n'est cependant pas le cas de toutes les lectines. Ainsi, la ConA et la GNA que nous avons étudiées, ne sont pas glycosylées (Olson et Liener, 1967 ; Shibuya *et al.*, 1988a) .

La **masse moléculaire** des lectines varie énormément d'une molécule à l'autre. L'agglutinine d'*Urtica dioica* L. (UDA), la lectine la plus petite isolée à ce jour, a une masse moléculaire de l'ordre de 8 à 9 kDa (Broekaert *et al.*, 1989) alors que celle de l'une des lectines isolées de *Phaseolus lunatus* L. est de 245 kDa (EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA 94401).

Exceptée à ce jour l'UDA, toutes les lectines sont constituées d'au **moins deux sous-unités**. Ainsi la ConA, tétramère de 106 kDa, est constituée de quatre sous-unités identiques de 26,5 kDa. Pour cette lectine, l'association de ses sous-unités est dépendante du pH : en-dessous d'un pH de 5,6 seules deux sous-unités s'associent pour former un dimère[27], alors que pour des valeurs supérieures la forme tétramérique est observée (Goldstein et Poretz, 1986). De même, la GNA est un tétramère de 50 kDa constitué de quatre sous-unités identiques de 13 kDa (Van Damme *et al.*, 1987). Les sous-unités constitutives d'une lectine ne sont pas obligatoirement identiques. Les lectines à mannose strict sont par exemple des homo-oligomères (GNA, NPA) alors que les lectines à mannose/glucose à plus large spectre de spécificité sont généralement constituées de plusieurs sous-unités α et β (la ConA constitue une exception - tableau 5).

Pour certaines lectines, l'activité biologique est associée à la présence de **cations bivalents**. Ainsi, la ConA est une métalloprotéine, dont l'activité biologique nécessite obligatoirement la présence de manganèse (Mn^{2+}) et de calcium (Ca^{2+}) (Edelman *et al.*, 1972). En revanche, l'activité de la GNA n'est pas dépendante de la présence de tels cations (Van Damme *et al.*, 1987).

Il existe de nombreuses **homologies structurales** entre les lectines végétales, tant au niveau de leurs séquences en acides aminés, que de leurs structures tridimensionnelles. Certains auteurs (Strosberg *et al.*, 1986 ; Chrispeels et Raikhel, 1991) suggèrent que cette structure a été fortement conservée pendant l'évolution, conséquence probable du maintien de fonctions physiologiques aujourd'hui encore mal définies. Les différences constatées entre les lectines des Légumineuses par exemple, peuvent s'expliquer par des mutations ponctuelles simples. De ce point de vue, elles constituent de bons marqueurs phylogénétiques pour étudier les processus de spéciation par des méthodes de biologie moléculaire (Rougé *et al.*, 1987). En dépis de ces très fortes homologies structurales, les spécificités osidiques des lectines des Légumineuses sont parfois très différentes (paragraphe suivant). Des travaux ont été entrepris depuis quelques années pour comprendre l'interaction moléculaire de ces lectines avec des oses, des dérivés d'oses et des structures glycanniques complexes. Le site de liaison au mannose de la ConA, de la lectine de la lentille (LcH) ou de *Lathyrus ochrus* a par exemple été caractérisé au sein des structures tridimensionnelles de ces polypeptides (Derewenda *et al.*, 1989 ; Bourne *et al.*, 1990b ; Bourne *et al.*, 1992; Delbaere *et al.*, 1993; Rini *et al.*, 1993; Ayouba *et al.*, 1994). Nous revenons sur ce point lors de la discussion en fin de Chapitre 4.

---

[27] En dessous d'un pH=5, le dimère conserve sa spécificité osidique mais ne précipite plus les polysaccharides (Goldstein et Poretz, 1986).

3.2.2. La spécificité osidique des lectines est à la base de leur classification

La spécificité osidique des lectines se définit en terme de **concentration minimale de monosaccharides** nécessaire pour inhiber l'agglutination ou la réaction de précipitation des cellules animales induite par ces molécules (Goldstein et Hayes, 1978 ; Goldstein et Poretz, 1986). Au regard des observations de Krüpe (1956, cité par Goldstein et Poretz, 1986), et de ses propres études, Mäkelä (1957) suggère que les monosaccharides réagissant avec les lectines peuvent être divisés en **quatre classes**. Cette classification se base sur la structure stéréo-isomérique des groupements hydroxyles en C-3 et C-4 du cycle pyranose (figure 7). Elle permet ainsi de distinguer dans un premier temps **quatre groupes** de lectines :

-1) les lectines, telles celles de *Lotus tetragonolobus* et *Ulex europaeus* L. se liant au **L-fucose** (sucre de la classe I) ;

-2) les lectines, comme celle du soja, se liant au **galactose** et/ou à la **N-acétylgalactosamine** (sucres de la classe II) ;

-3) les lectines, telles la ConA ou la GNA, se liant au **mannose** et/ou au **glucose** (sucres de la classe III selon Mäkelä) ;

-4) à ce jour, il n'a pas encore été mis en évidence de lectines interagissant avec l'un des sucres de la classe IV (idose, gulose, L-glucose et L-xylose).

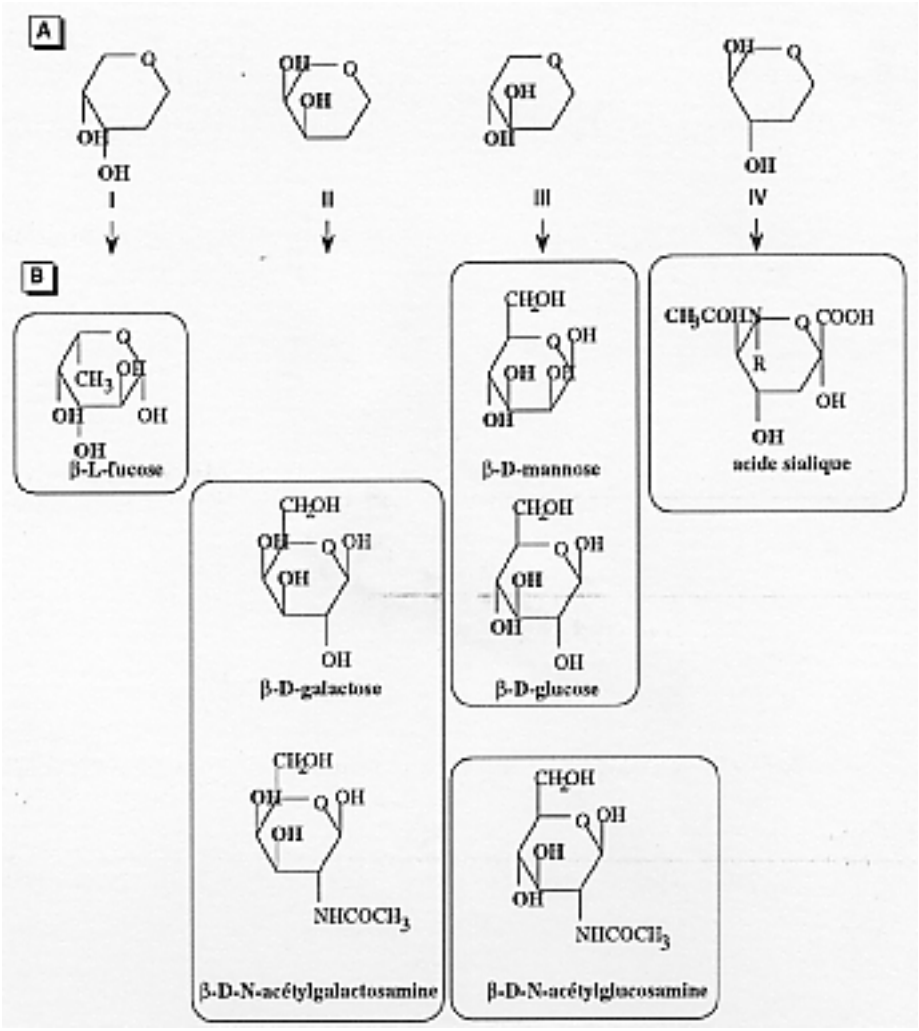


*Figure 7 – **A.** Classification des sucres selon Mäkelä basée sur la position des groupements hydroxy les en C-3 et C-4 du cycle pyranose*

***B.** Structures des sucres reconnus par les lectines des cind principales classes.*

Aux trois premiers groupes de lectines qui viennent d'être cités, il faut rajouter aujourd'hui les lectines à **N-acétylglucosamine**, comme les lectines du blé (*Triticum vulgare* Vill.) ou de *Datura stramonium* L., les lectines se liant à l'**acide sialique** (telles les lectines de certains crustacés) et des lectines aux sites de fixation "complexes". Le tableau 6 présente un résumé des spécificités osidiques des lectines testées au cours de notre étude :

Lectines et origines végétales	Abréviations	Spécificités osidiques
Lectines à Man / Glc		
Allium sativum	ASA	αMan ? βMan ?
Canavalia ensiformis	ConA	αMan > αGlc > GlcNAc
Cicer arietinum	CPA	αMan ? βMan ? fétuine
Galanthus nivalis	GNA	αMan
Lens culinaris	LcH	αMan > αGlc > GlcNAc
Narcissus pseudonarcissus	NPA	αMan
Pisum sativum	PSA	αMan > αGlc = GlcNAc
Vicia faba	VFA	αMan > αGlc = GlcNAc
Vicia villosa	VVAm	αMan ; βMan ?
Lectines à Glc / GlcNAc		
Griffonia simplicifolia II	GS II	αGlcNac = βGlcNac
Triticum vulgaris	WGA	GlcNac(β1,4GlcNac)$_{1-2}$ > βGlcNac > Neu5Ac
Ulex europaeus II	UEA II	L-Fucα1,2Galβ1,4GlcNAc > GlcNAc(β1,4GlcNAc)$_{1-3}$
Urtica dioica	UDA	βGlcNac
Lectines à GalNAc		
Amaranthus caudatus	ACA	GalNAc ?
Arachis hypogaea	PNA	Galβ1,3GalNAc > α et βGal
Artocarpus integrifolia	Jacaline	αGal ; αGalNAc
Bryonia dioica	BDA	GalNAc > Lac > Mel
Cytisus scoparius	CSA	βGal
Erythrina cristagalli	ECA	Galβ1,4GlcNAc > α GalNAc > Ga
Glycine max	SBA	α et βGalNAc > α et βGal
Phaseolus coccineus	PCA	idem PHA ?
Phaseolus lunatus	LBA	GalNAcα1,3[L-Fucα1,2]Galβ > GalNAc
Phaseolus vulgaris	PHA (L ou E)	Galβ1,4GlcNAcβ1,2Man
Sambucus nigra	SNA	GalNAc = Lac > Gal
Sophora japonica	SJA	GalNAc > Gal
Trichosanthes kirilowii	TKA	βGal
Tulipa sp.	TL	GalNAc > Lac > Gal ; fétuine
Vicia villosa	VVA	αGalNAc
Lectines à L-Fucose		
Ulex europaeus I	UEA I	αL-Fuc
Lectines autres (ac. sialique - comp		
Maackia amurensis	MAA I	Neu5Ac
	MAA II	complexe
Robinia pseudacacia	RPA	complexe

Tableau 6 - Spécificités osidiques des lectines végétales testées sur différentes espèces de pucerons, en particulier Acyrthosiphon pisum.
partiellement d'après Goldstein et Poretz, 1986 ; références plus précises dans le tableau 5.

Fuc = fucose ; Gal = galactose ; Glc = Glucose ; GalNAc = N-acétylgalactosamine ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Lac = lactose ; Man = mannose ; Mel = mélibiose ; Neu5Ac = acide neurosaminique (sialique).

L'appartenance de lectines à un classe donnée signifie qu'elles possèdent les mêmes spécificité osidiques globales, mais nous verrons ultérieurement que ces lectines peuvent présenter des comportements assez différents vis-à-vis de divers oligosaccharides (c'est le cas en particulier de la ConA et de la GNA - Chapitre 4). Ce sont en fait ces molécules complexes, présentes sur des glycoprotéines diverses, qui constituent les ligands physiologiques naturels des lectines.

3.2.3. Quelques propriétés biologiques des lectines

Les propriétés biologiques des lectines sont décrites en détail par Lis et Sharon (1986). Ce paragraphe constitue un bref aperçu de quelques-unes d'entre elles. Le tableau 7 résume en partie ces propriétés et les applications qui en découlent.

L'agglutination cellulaire est la manifestation la plus facile à observer de l'interaction entre une lectine et des cellules. Elle ne peut avoir lieu que si la lectine se lie par de multiples pontages aux cellules, mais il n'y a pas de corrélation simple entre la concentration en lectine et le nombre de cellules agglutinées. Il existe ainsi des exemples où un nombre important de molécules de lectines se lient aux cellules sans les agglutiner. En fait, la réaction d'agglutination est sous la dépendance de nombreux facteurs tels que les propriétés moléculaires des lectines (nombre de sites de fixation aux sucres, masses moléculaires), les caractéristiques de la surface cellulaire (nombre et accessibilité des sites de fixation, fluidité de la membrane cellulaire) et l'état physiologique des cellules. La réaction d'agglutination de cellules est le résultat d'une interaction spécifique entre la lectine et un sucre présent à la surface de celles-ci. Cette réaction peut être inhibée par ajout dans le milieu réactionnel du sucre en question sous forme libre (inhibition par compétition). Nous avons vu que cette caractéristique est à la base de la détermination de la spécificité osidique des lectines. Elle permet inversement de préciser les sucres présents à la surface des cellules. Nous utilisons nous mêmes cette caractéristique pour préciser le mode d'action des lectines sur les pucerons.

Propriétés	*Applications*
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	- typage du sang - identification de nouveaux groupes sanguins
Induction de la mitose	- étude de la constitution chromosomique de la cellule et détection des anomalies
Agglutination cellulaire	- recherche sur l'architecture des membranes externes cellulaires, leurs changements et transformations, - phagocytose et motilité. Diminution de la croissance des cellules tumorales.
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	- isolement, purification et études structurales des glucides, - purification des glycoconjugués (enzymes, hormones) - modèles pour la réaction antigène-anticorps (test ELISA, etc)
Liaison aux sucres	- études des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines, - structure et fonctionnement des membranes

Tableau 7 - Exemples de propriétés biologiques des lectines et des applications qui en résultent (d'après Lis & Sharon, 1986).

Mitogénicité : Certaines lectines peuvent stimuler les mitoses des lymphocytes ou l'induction de transformations blastiques. La ConA et la PHA, la lectine du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), sont en particulier des lectines mitogènes qui font l'objet de nombreux

travaux en immunologie. Ces lectines provoqueraient une transformation des lymphocytes après reconnaissance d'un récepteur spécifique[28] à leur surface.

Toxicité vis-à-vis des mammifères : les lectines font l'objet de nombreuses études toxicologiques. Depuis des années, elles sont en effet retrouvées dans beaucoup de plantes destinées à l'alimentation animale ou humaine (la lectine de la légumineuse tropicale *Canavalia ensiformis* n'est qu'un exemple parmi d'autres) et induisent fréquemment une diminution de la valeur nutritionnelle des matières premières végétales qui en contiennent (Jaffé et Seidl, 1992). Les haricots contiennent ainsi des fractions protéiques hémagglutinantes qui affectent la croissance et peuvent causer la mort d'animaux qui en consomment. Le mode d'action des lectines n'est qu'imparfaitement connu. Les travaux d'équipes comme celle d' A. Pusztai[29] permettent cependant d'avancer quelques hypothèses. Nous les résumons dans les annexes 3A et 3B. Un des modes d'action invoqués chez le rat serait une liaison des lectines (PHA ou ConA) avec des groupements récepteurs de la surface des cellules de la muqueuse intestinale pouvant induire des défaut d'absorption des nutriments (Pusztai, 1991). Nous reprenons plus en détail ces hypothèses en introduction du Chapitre 4.

3.2.4. Les fonctions des lectines dans la plante

Depuis de nombreuses années, des études sont consacrées à la mise en évidence des fonctions physiologiques des lectines végétales. Ces recherches s'effectuent selon deux approches :

-1) accumulation des informations sur les propriétés biochimiques des lectines et sur leur distribution dans les tissus aux différents stades de croissance des plantes ;

-2) élaboration d'hypothèses concernant les fonctions des lectines sur la base des informations acquises et confirmation de ces hypothèses par des expériences adéquates.

Les premiers travaux sur les lectines se sont principalement axés sur les protéines des graines[30], mais leur distribution ne se limite pas seulement à cet organe de réserve. Des lectines sont détectées aussi bien dans les feuilles, que dans les tiges ou les racines. En outre, dans une même plante, quelle que soit la famille végétale considérée, les propriétés des lectines peuvent différer d'un tissu à un autre.

A la suite de ces études, des hypothèses sur les **fonctions physiologiques** des lectines ont été avancées. Force est de constater cependant qu'à l'heure actuelle beaucoup de ces fonctions restent encore hypothétiques faute de preuves formelles :

-1) La spécificité des lectines et les propriétés conférées par leurs sites multiples de valence amènent certains auteurs à les comparer à des anticorps, et à proposer alors pour ces molécules un rôle d'**"anticorps"** chez les **plantes**. Cependant, une augmentation de la synthèse des lectines lors de l'exposition de la plante à un antigène (caractéristique importante des anticorps animaux) n'a jamais été démontrée. Sans être de véritables anticorps de la plante, les lectines peuvent jouer le rôle de **molécules constitutives de défense** contre des parasites. De nombreuses études révèlent ainsi l'existence d'interactions entre des lectines et des microorganismes (Pistole, 1981 ; Etzler, 1986). Ces constatations ne prouvent pas pour autant qu'*in planta* la fonction des lectines soit de reconnaître les microorganimes (au sens à la fois de la discrimination et de la réaction enclenchée), mais montrent simplement que par leur spécificité osidique, ces molécules sont capables de cette reconnaissance. Un rôle actif de

---

28 "triggering receptor" selon Lis et Sharon, 1986).

29 Il dirige une équipe au "Rowett Research Institue" (Aberdeen, Ecosse), qui s'est notamment spécialisée dans l'étude des pathologies induites par les lectines chez les mammifères (modèle rat).

30 Les lectines sont généralement présentes en grande quantité dans les graines et plus faciles à purifier.

défense des lectines contre certains champignons pathogènes[31] est cependant démontré suggérant qu'une des fonctions des lectines est de protéger les plantes de ces champignons au moment de l'imbibition, de la germination et des premiers stades de développement (Etzler, 1986). La résistance de certaines plantes aux infections bactériennes se trouve également liée à la présence de lectines qui interviendraient dans un processus de reconnaissance et d'encapsulation de ces agents infectieux.

-2) au contraire, d'autres études suggèrent que les lectines favorisent l'**invasion** des plantes par des **pathogènes** en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (Etzler, 1986).

-3) la **symbiose** entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les Légumineuses est un processus complexe qui s'établit en plusieurs étapes : adhésion de la bactérie aux racines, internalisation et nodulation. Elle confère aux Légumineuses la propriété de fixer l'azote atmosphérique. Ce processus requiert un haut degré de spécificité : un souche de *Rhizobium* peut noduler uniquement certaines légumineuses. Une littérature abondante fait état de travaux visant à démontrer le rôle des lectines dans ce processus de reconnaissance bactérie-plante (Kaminski, 1987; Diaz *et al.*, 1989).

-4) de nombreuses **autres fonctions** des lectines, autres que celles de la reconnaissance de bactéries ou de microorganismes que nous venons d'évoquer, sont avancées : fonction dans l'élongation des parois cellulaires ; fonction de co-facteurs enzymatiques agissant avec des enzymes glycoprotéiques, intervention dans le transport des glucides et dans leur mise en réserve dans les graines, contrôle de la division cellulaire (mitogénicité) et de la germination, intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (Etzler, 1986 ; Kaminski *et al.*, 1987).

La littérature très abondante révèle l'intérêt de nombreuses d'équipes de recherche pour confirmer ou infirmer ces hypothèses. Etzler (1986) remarque cependant à juste titre que la spécificité osidique des lectines n'est probablement qu'une des propriétés fonctionnelles de ces molécules. En plus de leurs sites de fixation aux sucres, certaines lectines possèdent en effet des sites leur permettant de se lier avec d'autres types de ligands. La Concanavaline A, par exemple, possède un site de liaison spécifique au myo-inositol (Wassef *et al.*, 1985). Ainsi, d'autres fonctions encore inexplorées pourraient être liées à la présence de ces autres sites non-sucre spécifiques.

Nous avons décrit la situation chez les plantes, mais la présence des lectines dans le monde vivant est beaucoup plus large. La fonction physiologique générale (en supposant qu'elle existe) de ces molécules que l'on trouve dans des organismes aussi différents que les champignons, les végétaux, les bactéries, les virus, les insectes ou les mammifères, reste à trouver. Au niveau des plantes, la fonction de défense clairement mise en évidence pour certaines lectines, pourrait être un aspect secondaire qui aurait été sélectionné de par l'avantage sélectif qu'il confère.

3.3. Action des lectines sur les insectes *in planta* et *in vivo* - Connaissances actuelles

Bien qu'aujourd'hui encore, les fonctions des lectines dans les plantes ne soient pas encore bien comprises, des études mettent clairement en évidence que ces molécules jouent un rôle de défense contre certains insectes phytophages. Afin d'exploiter cette propriété, des équipes se sont récemment orientées vers la recherche de lectines végétales présentant des effets

[31] Blocage de la croissance des hyphes (filaments mycéliens pénétrant dans les tissus du végétal).

toxiques sur des insectes considérés comme d'importants ravageurs en agriculture et susceptibles d'être utilisées dans une stratégie de création des plantes transgéniques résistantes à ces insectes.

Les premiers travaux portant sur l'identification de lectines comme facteurs biochimiques de résistance des plantes à des insectes concernent essentiellement les **Coléoptères**. En 1976, Janzen et Juster montrent que des larves de la bruche du niébé[32], *Callosobruchus maculatus* (Fabricius), sont incapables d'attaquer des graines de haricot commun, *Phaseolus vulgaris* , du fait de la présence d'une lectine, la PHA.

Des tests sur milieux artificiels contenant la lectine purifiée à des concentrations variant de 0,1 % à 5 % [33], montrent qu'aucune larve ne survit à la plus forte concentration et qu'une réduction significative du temps de développement jusqu'à l'âge adulte est obtenue pour la concentration de 0,1 %. Depuis, ces résultats ont été confirmés par Gatehouse et ses collaborateurs (1984). Ces auteurs invoquent des lésions au niveau de l'épithélium mésentérique des bruches entraînant un blocage de l'adsorption des nutriments[34] (Chapitre 4). Des observations analogues sur la croissance et la survie de la bruche du niébé sont rapportées avec la lectine du haricot ailé, *Psophocarpus tetragonolobus* [L.] DC (Gatehouse *et al.*, 1991b). D'une manière générale, la plupart des variétés de haricot ne sont pas résistantes aux bruches bien qu'elles présentent de fortes concentrations en lectines dans leurs graines. Une des explications avancées est l'existence d'un mécanisme de détoxification permettant aux insectes de tolérer une alimentation riche en ce type de toxines[35] (Gatehouse *et al.*, 1989).

Ces premières lectines observées pour leur propriété insecticide s'avèrent très rapidement non exploitables dans le cadre d'une stratégie de création de plantes transgéniques résistant aux insectes : la PHA et la lectine du haricot ailé sont également toxiques pour les mammifères (Pusztai *et al.*, 1979a). Des auteurs ont alors procédé au criblage systématique d'un grand nombre de lectines vis à vis de différents insectes.

Comme précédemment les essais s'effectuent dans un premier temps sur **Coléoptères**. En 1990, Murdock et ses collaborateurs testent dix-sept lectines contre la bruche du niébé *C. maculatus* sur milieux artificiels. Cinq d'entre elles induisent un retard significatif du temps de développement de la bruche à des concentrations comprises entre 0,2 % et 1,0 % (tableau 3) :

- les lectines à N-acétyl-galactosamine (GalNAc) de l'oranger des osages (MPA) et de l'arachide (PNA) ;
- les lectines à N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) de la pomme de terre (STA), de *Datura stramonium* (DSA) et du blé (WGA).

Parmi ces cinq molécules, la WGA s'avère la plus toxique. Deux autres lectines à GlcNAc, les lectines du riz (OSA) et de l'ortie (UDA) se montrent aussi intéressantes que la WGA (Huesing *et al.*, 1991a).

Czapla et Lang (1990) testent également une trentaine de lectines et montrent que seules trois d'entre elles sont toxiques pour *Diabrotica undecimpunctata howardii* Barber[36], à des doses de 1 à 2 % : les lectines du ricin (RCA), de *Phytolacca americana* L. (PWA) et de l'algue marine bleue (*Codium fragile* (Suringar) Har.).

Bien que moins toxiques, certaines des autres lectines testées (la WGA notamment), inhibent cependant de plus de 40 % la croissance des larves. La lectine d'*Eranthis*

---

32 Niébé, *Vigna unguiculata* L. Walp

33 Dans les graines des différentes variétés de *Phaseolus vulgaris* les concentrations en lectine varient de 1 % à 3 % (Gatehouse *et al.*, 1990b).

34 Huesing et al. (1991b) ont cependant remis en cause ces résultats, suggérant que la toxicité induite par la toxine purifiée s'expliquerait en fait par une contamination des préparations par un inhibiteur d'α-amylase (αAI).

35 Ces mécanismes de détoxification serait basé sur : -1) une protéolyse partielle des lectines ingérées ; -2) une incapacité des toxines intactes de passer au travers des pores de la membrane péritrophique et donc de se lier à l'épithélium mésentérique.

36 La chrysomèle maculée du concombre, coléoptère, dont les larves sont des ravageurs majeurs du maïs.

hyemalis [L.] Salisb. (EHL) se révèle également toxique pour *D. undecimpunctata* (Kumar *et al.*, 1993), de même que la SNA-I[37] (Gatehouse *et al.*, en préparation).

Il semble que les lectines à galactosamine et à glucosamine soient plus particulièrement toxiques pour les espèces de coléoptères étudiées, mais des lectines à mannose (lectine du pois, PSA, et du perce-neige, GNA), se montrent également actives sur *C. maculatus* (Czapla et Lang, 1990).

Peu de travaux mentionnent la toxicité des lectines sur des **Lépidoptères**, hormis ceux de Czapla et Lang sur la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (tableau 3). Une lectine de Césalpiniacées (*Bauhinia purpurea* L., BPA) est très toxique vis-à-vis de la pyrale, de même que les seules lectines testées des familles de Poacées (WGA) et d'Euphorbiacées (RCA). Toutes les lectines des autres familles n'induisent aucun effet. Ainsi la pyrale ne semble pas sensible aux lectines des Solanacées (trois protéines testées), ni à celles des Fabacées (treize protéines testées). Citons encore le cas de la lectine du soja (SBA) qui provoque seulement une inhibition de croissance des larves d' *O. nubilalis* de l'ordre de 25 %, à la concentration de 1 % (Czapla et Lang, 1990), alors que Shukle et Murdock (1983) observent à cette même concentration une forte toxicité vis à vis de *Manduca sexta* (L.)[38].

Ces premiers résultats sur Coléoptères et Lépidoptères montrent qu'il est difficile de corréler l'activité insecticide des lectines à leur seule spécificité osidique *in vitro* telle que nous l'avons définie précédemment : des lectines d'une même classe, induisent des effets différents sur un même insecte.

Les travaux de Czapla et Lang visent à mettre en évidence une corrélation entre l'activité entomotoxique des lectines et leur origine botanique. S'ils demandent à être complétés pour les lectines de la famille des Césalpiniacées, des Poacées et des Euphorbiacées, cette démarche reste intéressante. En effet, la recherche des lectines toxiques pour un insecte donné peut être réalisée selon deux étapes complémentaires :

-1) criblage de lectines dans un large spectre de spécificités osidiques, et de différentes origines végétales ;

-2) criblage de lectines d'une même famille végétale choisie par l'étape précédente et généralement à spécificité osidique plus restreinte.

C'est la démarche que nous adoptons dans le cadre de notre étude sur les pucerons, et qui explique que nous nous intéressons particulièrement aux lectines de la famille des Amaryllidacées, qui sont des lectines à mannose strict (GNA, et lectine de la jonquille, NPA).

Des lectines "équiperont" très probablement dans les années qui viennent des plantes transgéniques commercialisées résistantes à des coléoptères et des lépidoptères (tableau 4). Ainsi par exemple, l'équipe de Gatehouse a créé des tabacs résistants à la noctuelle *Heliothis virescens* (F.) par l'introduction des gènes de la lectine du pois (PSA) et d'un inhibiteur trypsique du niébé. La relative résistance des lectines à la protéolyse permet d'espérer que ce mécanisme de contournement de toxicité ne soit pas un obstacle majeur à leur utilisation. Des toxicités différentielles entre espèces de Coléoptères sont néanmoins déjà attribuées à ce phénomène. La toxicité mammalienne de certaines lectines est relevée (RCA, OSA, WGA, UDA) et doit être gérée avec pertinence ; *a contrario*, la possibilité d'effets positifs sur la nutrition de mammifères a été observée et peut servir d'attrait supplémentaire pour ce type de gènes.

---

37 Une des deux lectines purifiées de la baie du sureau, *Sambucus nigra* L., spécifique de l'acide sialique.

38 Sphinx du tabac.

Ces études sur les Coléoptères et les Lépidoptères n'ont été suivies que très récemment par des travaux sur les **Homoptères** (Powell *et al.*, 1993). La GNA s'avère très toxique pour un delphacide et une cicadelle du riz (*N. lugens* et *Nephotettix cinciteps* Uhler). La WGA montre aussi une toxicité intéressante vis-à-vis de ces espèces, et d'une autre cicadelle, *Empoasca fabae* (Harris) (Habibi *et al.*, 1993). Simultanément, une étude de la toxicité des lectines sur les pucerons est initiée dans notre laboratoire (Rahbé et Febvay, 1993). Elle est à l'origine des travaux présentés ici. Nous revenons au cours de la présentation de notre travail sur les résultats décrits par K. Powell et les chercheurs de son laboratoire d'accueil avec lesquels nous avons collaboré.

Les travaux de Rahbé et Febvay (1993) montrent, qu'administrée en milieu artificiel, la lectine à mannose/glucose, la Concanavaline A présente des propriétés toxiques intéressantes vis à vis du puceron du pois, *A. pisum.* Notre démarche consiste dans un premier temps à préciser les effets biologiques de ces lectines. Ceci est entrepris par l'analyse des effets d'une même lectine sur différentes espèces de pucerons, et ceux des lectines à spécificités osidiques très proches (lectines à glucose/mannose) sur un même puceron, par l'observation des effets à long terme de doses sublétales.

Dans la seconde étape de notre travail, nous nous focalisons sur l'étude des effets des lectines sur le comportement d'alimentation des pucerons. Cette approche a nécessité une importante mise au point de tests comportementaux. Nous avons également fait appel à des techniques plus précises (mais plus lourdes) pour mesurer l'ingestion des pucerons à l'aide d'un marqueur radioactif, et pour observer leur comportement d'alimentation (technique dite d'électropénétrographie).

Enfin, dans une troisième étape nous abordons le mode d'action des lectines retenues à l'aide de techniques biochimiques (électrophorèse, histologie, immunomarquage, ELISA). Cette approche nous permet de mettre en évidence les tissus cibles des lectines, de décrire les conséquences induites par l'intoxication sur la physiologie des pucerons et d'élaborer des hypothèses quant au mode d'action des lectines au niveau moléculaire. Cette dernière étape aurait dû constituer une part plus importante de ce travail mais a du être limitée pour des raisons extérieures à l'organisation de la thèse.

Chapitre 2

Effets des lectines sur la biologie des pucerons

1. Introduction

Depuis quelques années, les recherches se sont intensifiées pour mettre en évidence des protéines entomotoxiques. La dernière partie du chapitre 1 résume l'avancée de ces travaux. Si les premières études ont essentiellement porté sur les Coléoptères, les Homoptères sont désormais également visés. Il est aujourd'hui envisageable d'exploiter les propriétés toxiques de certaines protéines pour créer par génie génétique des plantes résistantes aux insectes.

Une étape importante pour juger si un gène est exploitable ou non en transgénèse, est la caractérisation de la toxicité et du mode d'action de la protéine codée, vis à vis de l'insecte visé. Notre travail sur les lectines et les pucerons s'inscrit précisément dans cette démarche. Des études antérieures ont montré que des lectines étaient toxiques vis à vis de différentes espèces d'Homoptères (Gatehouse *et al.*, 1992 ; Rahbé et Febvay, 1992 ; Habibi *et al.*, 1993 ; Powell *et al.*, 1993 ; Rahbé et Febvay, 1993). Les lectines constituent une classe de protéines aux propriétés physico-chimiques et biologiques très variées. Les pucerons quant à eux représentent une famille d'insectes très large comprenant en particulier de nombreuses espèces fortement nuisibles. Il est donc important dans un premier temps de pouvoir évaluer les critères de spécificité de l'interaction pucerons/lectines, notamment en confrontant une large gamme de lectines à un puceron modèle, et en précisant l'activité des plus intéressantes d'entre elles sur plusieurs espèces d'intérêt agronomique.

Une trentaine de lectines ont ainsi été testées sur notre puceron modèle *A. pisum*. Les lectines à mannose/glucose induisent les effets toxiques les plus intéressants, en particulier la Concanavaline A (ConA) et la lectine du perce-neige (GNA). Ces résultats ont guidé notre choix vers l'étude de ces deux toxines. La ConA s'avère également toxique pour cinq autres espèces de pucerons appartenant à deux "tribus" taxonomiques. Des toxicités différentielles sont cependant observées entre ces espèces. Inversement, nous avons également constaté que des lectines à spécificités osidiques très proches (lectines à mannose) n'induisent pas les mêmes effets toxiques.

Nous décrivons les effets de concentrations sublétales (*i.e.* induisant des inhibitions de croissance sans mortalité larvaire appréciable) de la ConA et de la GNA sur la fécondité de pucerons placés sur des milieux artificiels. Les biologistes moléculaires espèrent faire s'exprimer les lectines à de telles concentrations dans la sève phloémienne de plantes transgéniques lorsqu'ils disposeront de promoteurs phloème-spécifiques. D'ores et déjà, des pommes de terre transformées avec un promoteur constitutif, exprimant le gène de la GNA et/ou d'une chitinase, ont été mises à notre disposition par le Département de Biologie de l'Université de Durham (Dr J.A. & A.M.R. Gatehouse). Les performances biologiques de pucerons sur ces plantes sont décrites. Les résultats obtenus sont discutés en les comparant avec ceux observés sur milieux artificiels.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Origines et élevage des insectes

L'origine et les conditions d'élevage des six espèces de pucerons qui ont fait l'objet de notre étude sont données dans la fiche-protocole N°1. Avant chaque test, les populations d'aphides sont homogénéisées par "synchronisation" de leur production. Des adultes ailés matures sont transférés sur des jeunes plants. Après 48 h, ils sont retirés et les larves issues de cette ponte sont laissées sur les plantes le temps de leur développement complet (4 stades larvaires, 7 à 9 jours suivant les espèces de pucerons), à faible densité de population. Les jeunes adultes aptères obtenus sont transférés sur de nouveaux plants et laissés à pondre 24 h. Les larves issues de cette ponte sont alors transférées sur les milieux artificiels ou les plantes transgéniques à tester[39]. Les adultes sont mis à pondre pendant 3 ou 4 jours de suite lorsqu'une longue série de protéines est testée (un témoin et deux à trois protéines par jour). Ce protocole a été adopté en particulier pour tester une série de vingt-sept protéines sur *A. pisum* et une série de huit toxines sur *M. persicae*.

2.2. Origines des lectines purifiées testées

La plupart des lectines purifiées proviennent de chez EY-Laboratories (San Mateo, CA USA) ou de chez Sigma (St Louis, MO USA). Leurs références sont données dans la fiche-protocole N°2. Les abréviations utilisées correspondent à celles du catalogue EY-Laboratories[40]. Les lectines à mannose du perce-neige (GNA), de la tulipe (NPA) et de l'ail (ASA) ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur mannose-agarose et analysées par chromatographie échangeuse d'ions (Van Damme *et al.*, 1991; Van Damme *et al.*, 1992). La lectine de *Rhizoctonia solani* (RSA) est purifiée par chromatographie d'affinité sur gomme arabique couplée à du sépharose 6-B (Vranken *et al.*, 1987). Ces trois lectines nous ont été fournies par W. Peumans et E. Van Damme (Université de Leuven, Belgique). Toutes les lectines testées se présentent sous la forme de poudre lyophilisée, sans sel et de pureté protéique supérieure à 90 %. Leur concentration dans les milieux artificiels est exprimée en microgrammes de poudre dissoute par millilitre de milieu ($\mu g.ml^{-1}$).

2.3. Composition et préparation des milieux artificiels

Le milieu artificiel que nous appellerons Ap2, est le milieu de base dans lequel les protéines à tester sont dissoutes. Sa composition est identique à celle du milieu A5 mis au point initialement pour le clone LL01 d'*A. pisum* (Febvay *et al.*, 1988a), sauf pour la concentration en saccharose qui est de 20 % (fiche-protocole N°3). Le milieu standard Ap2 permet un développement optimal des pucerons sur une génération complète (les larves de la deuxième génération survivent mais ont une fécondité très réduite). Ils sont cependant généralement plus petits que ceux élevés sur plante hôte favorable. Par exemple, le poids moyen de *M. persicae*, 24 h après la mue imaginale est de l'ordre de 220 µg sur Ap2 contre 250 µg sur fève. Parallèlement, la fécondité de la première génération est également réduite sur le milieu Ap2 (données non présentées). Toutes les larves des espèces testées, exceptées celles d'*A. gossypii*, s'y fixent rapidement. Le problème rencontré avec le puceron du melon a été partiellement résolu en plaçant les larves dans l'obscurité totale pendant 3 jours juste après leur dépôt.

Les solutions contenant les protéines à tester sont préparées par dilutions d'une solution mère à 1 $mg.ml^{-1}$. Pour les tests d'intoxication aiguë en particulier, une série de cinq

---

39 Nous prélevons les larves les plus grosses que nous supposons âgées de 12h à 24h. Pour faciliter les calculs ultérieurs, nous les considérerons toutes agées de 24 h au moment du dépot.

40 Les deux premières lettres correspondent correspondent aux initiales du nom latin de la plante dont sont purifiées les lectines. Dernière lettre "A" pour "agglutinine de ..."

concentrations comprises entre 5 (ou 10) µg.ml^{-1} et 750 µg.ml^{-1} (ou 1500 µg.ml^{-1} suivant la toxine) est préparée pour chaque protéine. Les solutions sont ensuite "coulées" entre deux feuilles de Parafilm® en conditions stériles (fiche-protocole N°4). Par la suite, nous emploierons indifféremment le terme "milieu" pour désigner la solution Ap2 ou l'ensemble du dispositif : solution, Parafilm®, support.

2.4. Principe des tests de toxicité aiguë *in vitro*

Au jour J0, des larves néonates sont déposées sur des milieux artificiels contenant les protéines purifiées aux concentrations indiquées précédemment (5 à 1500 µg.ml^{-1}) (n=3 ou 5 x 20, nombre indiqué dans le texte). Une heure après le dépôt, le pourcentage de larves fixées sur les milieux est relevé. C'est un indice de l'acceptabilité du milieu par les pucerons (Rahbé *et al.*, 1988). Les larves non fixées sont remplacées. Les pucerons sont laissés sur les milieux le temps de leur développement jusqu'à l'âge adulte (7 jours). Les milieux sont changés au jour J3 ou J4 (ou dès qu'une contamination est observée). La mortalité des larves est relevée chaque jour. Au jour J7, les pucerons aptères survivants[41] sont pesés individuellement sur une microbalance Setaram (modèle Y-214N, Lyon France, précision ± 1 µg). La toxicité de chaque protéine est ainsi exprimée *in fine* par deux indices dont le calcul est présenté plus loin :

-1) la **CL50**, la concentration en protéine nécessaire pour tuer la moitié des individus de la population initiale à J7 ;

-2) l'**IC50** (ou l'IC20), la concentration en protéine induisant une inhibition de croissance de 50 % (ou 20 %) à J7 par rapport aux individus sur les milieux témoins (fiche-protocole N°11).

2.5. Caractéristiques des lignées de pommes de terre transgéniques testées

6 lignées transgéniques de pommes de terre ont été testées avec *Myzus persicae* ou *Aulacorthum solani* dans le laboratoire de nos collègues anglais au cours de trois expériences indépendantes et réalisées, soit par A.M.R Gatehouse (juillet 1993) , soit par R. Down et moi-même (février 94 et janvier 95) :

	Myzus persicae	*Aulacorthum solani*	
		1ère série	2ème série
	juillet 93	février 94	janvier 95
Témoin*	x	x	x
PBG6#47	x	x	
PWG6#85	x	x	x
GNA2#23			x
GNA2#28			x
GNA2#30			x
WAI9#12			x

* la lignée témoin correspond à la variété Désirée utilisée pour l'élevage des pucerons et à l'origine des lignées transformées, elle n'est cependant pas transformée, mais multipliée végétativement dans les mêmes conditions que les lignées transformées.

41 Le pourcentage d'ailés est de l'ordre de 1 à 10 % suivant les espèces. Nous ne les avons pas inclus dans le calcul des inhibitions de croissance, car ils sont généralement plus petits que les aptères de même âge.

Le travail de transformation de la pomme de terre a été réalisé sur la variété Désirée. La technique de transformation (transfert indirect *via Agrobacterium*), les constructions de plasmides et les conditions de régénération des explants[42] ne sont pas détaillées dans le cadre de cette thèse. Ces informations sont données en partie par Gatehouse *et al.* (1995a).

Les trois gènes utilisés pour ce travail de transformation codent pour la GNA, la chitinase du haricot (BCH, Broglie et Broglie, 1993), et l'inhibiteur alpha-amylase du blé (WAI, Kashlan et Richardson, 1981). Quatre constructions ont été réalisées :

- deux constructions simples, la première avec le gène de la GNA, la seconde avec le gène de WAI, appelées respectivement GNA2 et WAI9 ;

- deux doubles constructions, l'une avec les gènes de la GNA et de WAI (PWG6), l'autre avec les gènes de la GNA et de la BCH (PBG6).

Le gène de la ß-glucuronidase (GUS) a été choisi comme gène rapporteur. Il a permis de sélectionner les plants transformés exprimant les ARN messagers des gènes introduits (Gatehouse *et al.*, 1995a). L'étape suivante a consisté à estimer les taux d'expression des transgènes dans ces plants en dosant les protéines recombinantes par la technique d'immunomarquage sur dépôts en tache[43]. En ce qui concerne la GNA (simples ou doubles constructions) et la BCH, les concentrations mesurées dans les extraits tissulaires des transplants sont de l'ordre de 1 à 2% des protéines solubles totales. Bien que de l'ARN ait été dosé dans tous les plants transformés avec le gène de WAI, cette protéine n'est pas détectée dans les extraits des transformants PWG6, ni WAI9.

Afin de confirmer que la GNA et la BCH sont correctement synthétisées par les pommes de terre transformées, des extraits de feuilles sont passés en électrophorèse (SDS-PAGE), les bandes protéiques obtenues sont transférées sur membrane de nitrocellulose pour être ensuite immunomarquées avec des anticorps spécifiques, et visualisées par chimioluminescence (système ECL, principe expliqué dans la fiche-protocole N°7) : la GNA et la BCH sont clairement mises en évidence (masses moléculaires respectives 12 kDa et 30 kDa - Gatehouse *et al.*, 1995a). Dans le cas de WAI, aucune protéine marquée n'est révélée.

Sur la base des résultats de ces dosages, une première lignée de pomme de terre transformée avec la double construction BCH/GNA a été retenue pour les tests biologiques, ainsi qu'une seconde transformée avec la construction WAI/GNA ; elles sont nommées respectivement PBG6#47 et PWG6#85. Trois lignées transformées avec la construction simple GNA2 (GNA2#23, GNA2#28 et GNA2#30) et une lignée transformée avec la construction simple WAI9 (WAI9#12) ont également été sélectionnées. En l'absence de lignée témoin transformée, les plantes de la lignée WAI9#12, dans lesquelles la WAI n'est pas détectée, sont considérées comme transplants témoins. Les plantes de chaque lignée sont obtenues par multiplication végétative *in vitro* (microbouturages des méristèmes apicaux).

2.6. Estimation des taux d'expression des transgènes par immunodétection sur membrane de nitrocellulose

Deux techniques d'immunomarquage sur membrane de nitrocellulose nous ont permis de doser qualitativement ("Tissue Blot") ou quantitativement ("Dot-Blot"), la GNA dans les feuilles des pommes de terre transgéniques. Les fiches-protocole N°5 et N°7 décrivent précisément ces deux techniques. Nos collègues britanniques ont également dosé les protéines WAI et BCH (Gatehouse *et al.*, 1995a), nous commentons leur résultats.

---

42 Régénération des plantules à partir de protoplastes.

43 Plus communément appelée technique "Dot Blot", son principe est décrit dans la fiche-protocole N°5.

2.7. Estimation indirecte du taux d'expression des transgènes par dosage ELISA d'intestins de pucerons

Lors de notre séjour à Durham, en janvier 1995, nous avons mis au point un protocole pour estimer la concentration en GNA dans le phloème des plantes transformées. Les pucerons étant quasi-exclusivement phloémophages, il est important de connaître la concentration de la GNA dans ce compartiment cellulaire pour évaluer dans quelle mesure la transformation permettra l'expression d'un effet aphidotoxique.

Six lots de larves de l'espèce *A. solani* sont laissés le temps de leur développement complet (huit jours), chacun sur une plante des lignées GNA2#23, GNA2#28, GNA2#30, PWG6#85, WAI9#12 ou une plante de la variété Désirée (témoin). Simultanément des lots de larves se sont développés sur des milieux artificiels Ap2 contenant 0, 5, 10, 50, 100 ou 500 µg. ml^{-1} de GNA. A l'issue des huit jours, dix pucerons de chaque lot sont disséqués et leurs tubes digestifs sont collectés (voir fiche-protocole N°8). Après broyage, la quantité de GNA dans des extraits équivalents à deux tubes digestifs est dosée par ELISA. Les fiches-protocole N°10A & 10B décrivent en détail ce dosage quantitatif de la GNA.

Les doses mesurées dans les tubes digestifs des pucerons placés sur plantes transgéniques sont comparées aux doses mesurées dans les tubes digestifs des pucerons intoxiqués sur milieux artificiels. En nous appuyant sur l'hypothèse que le "taux de rétention de lectine" par un puceron est, d'une part proportionnel à la concentration de lectine dans l'ingéré, et d'autre part comparable sur plante et sur milieu artificiel[44], nous avons essayé d'estimer la concentration de GNA dans la sève phloémienne des plantes transformées.

2.8. Principe des tests à "long terme" *in vitro* ou sur plantes transgéniques

Des tests à long terme ont été réalisés sur milieux artificiels à la fois sur *A. pisum* et sur *M. persicae*. Ces tests visaient à observer les effets de la ConA et de la GNA sur la dynamique de reproduction des pucerons pendant le temps une durée égale au temps de développement d'une génération (calcul du r_m). Les performances biologiques de *M. persicae* ont été observées ensuite sur pommes de terre transgéniques.

*2.8.1. Intoxication sublétale d'***A. pisum** *par la ConA, 1ère série*

Des larves néonates sont obtenues à partir d'une population "synchronisée" de pucerons de l'espèce *A. pisum* et sont transférées sur milieux artificiels Ap2 simples ou contenant de la ConA à 80 µg.ml^{-1} (trois répétitions de 25 individus par modalité). Cette concentration a été choisie au vu des résultats de l'intoxication aiguë. Nous nous attendions à ce qu'elle induise une mortalité des larves très faible, mais une réduction significative de leur croissance (IC≈35%).

Au jour J7 (durée normale de développement des larves), la mortalité est relevée dans chaque boîte, et les jeunes adultes aptères survivants sont pesés individuellement. Vingt individus sont alors choisis (les vingt pucerons dont les masses sont les plus proches de la moyenne calculée pour chaque modalité) et déposés individuellement sur leurs milieux artificiels respectifs[45] . Chaque jour, à la même heure, jusqu'à la mort de tous les pucerons, le nombre d'individus morts et le nombre de larves pondues dans chaque boîte sont notés.

*2.8.2. Intoxication sublétale d'***A. pisum** *par la ConA, 2ème série*

Une seconde série de tests a consisté à placer, dans un premier temps, des larves néonates sur des milieux Ap2 contenant 0, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 400 µg.ml^{-1} de ConA (n=4x20 pour la modalité "témoin" ; n=2x20 pour les modalités "ConA"). De même que dans

---

[44] Nous reviendrons sur ces hypothèses dans le chapitre Discussion.

[45] Les boîtes sont plus petites que celles utilisées pour les tests d'intoxication aiguë : diamètre 18 mm, hauteur 15 mm, 100 µl de milieu coulés par boîte.

la première série, la mortalité est relevée au jour J7, et les aptères survivants sont pesés. Après calcul des inhibitions de croissance, les modalités "ConA100" et "ConA200" sont retenues pour la suite de l'expérience (IC respectives 47 % et 60 %). En nous basant sur leurs masses, 20 individus de chacune des modalités "témoin" ou "ConA" sont choisis, puis transférés dans des boîtes individuelles. Les larves pondues et les adultes morts sont relevés quotidiennement. Les pucerons survivants sont également pesés au 15ème jour (c'est à dire après 7 jours de vie larvaire, plus 8 jours de vie adulte).

2.8.3. Intoxication sublétale de M. persicae *par la ConA et la GNA*

La fécondité des pucerons de l'espèce *M. persicae* intoxiqués par de la ConA ou de la GNA a également été évaluée. Le protocole suivi est identique à celui que nous venons de décrire pour *A. pisum*, à l'exception près que les jeunes adultes sont pesés et transférés au jour J8 et non à J7. Deux expériences indépendantes ont été conduites :

-1) l'une avec de la ConA à 140 $\mu g.ml^{-1}$;

-2) une seconde avec de la GNA à 215 et 450 $\mu g.ml^{-1}$.

Nous avons choisi des concentrations comprises entre les IC20 et les IC50 déterminées auparavant par les tests d'intoxication aiguë. Les vingt pucerons mis à pondre sont choisis sur la base de leur masse parmi quarante à soixante aptères survivants. Pour la GNA, les adultes sont pesés au jour J20.

2.8.4. Tests biologiques à "long terme" sur pommes de terre transgéniques

La fécondité de *M. persicae* ou d'*A. solani* sur des pommes de terre transgéniques est évaluée selon le principe que nous venons décrire pour les tests à long terme sur milieu : deux femelles matures sont déposées sur une feuille et isolées dans une "clip-cage" :

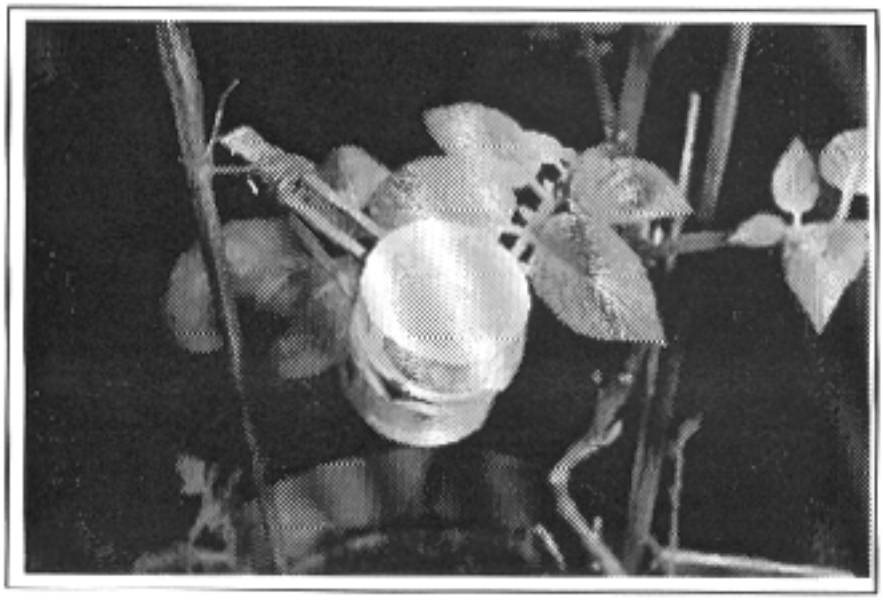


Figure 8 - Dispositif expérimental mis en place pour tester les effets des plantes transgéniques sur la croissance et la fécondité des pucerons M. persicae *et* A. solani *isolés individuellement sur une feuille.*

Pour chaque lignée témoin ou transgénique testée, trente lots de deux femelles sont ainsi répartis sur différentes plantes. Le nombre de plantes testées par lignée, et par conséquent le nombre de "cages" par plante, varie en fonction du nombre de plantes disponibles au moment du test (quatre à dix suivant les lignées). Après 24 h de ponte, les femelles sont retirées (jour J0). Nous laissons deux larves se développer pendant 6 à 8 jours (précisé dans le texte des résultats). A l'issue de cette période de développement larvaire, une femelle par "cage" est conservée pour la suite du test. Pour l'espèce *A. solani*, les pucerons ont alors été pesés (J8). Les larves filles sont dénombrées quotidiennement, à la même heure, et éliminées, jusqu'à la mort de tous les individus.

2.9. Méthodes d'analyse des données

2.9.1. Analyse globale des effets de vingt-sept lectines

Antérieurement à notre étude, des tests de criblage ont été réalisés au laboratoire sur des protéines de classes très différentes (venins, antibiotiques, enzymes diverses, inhibiteurs de protéases, hormones peptidiques, etc.). Ils ont révélé que certaines lectines présentaient des propriétés aphidotoxiques intéressantes. Ces lectines ont été soumises aux analyses précédemment décrites pour déterminer leurs CL50 et leurs IC50 (Rahbé et Febvay, 1993 ; Rahbé *et al.*, 1995).

Mais les données se rapportant à certaines d'entre elles s'accordent mal avec les modèles d'ajustement utilisés. Or, ces résultats semblent montrer une toxicité différentielle des diverses classes de lectines testées qui est mal rendue par ces seuls indices synthétiques. Il nous a donc semblé intéressant de reprendre les données brutes (masses, mortalités) pour les soumettre à une analyse en composante principale (ACP).

Ce type d'analyse permet en effet de condenser, de synthétiser et d'interpréter dans un espace intelligible (deux ou trois dimensions) les résultats se rapportant aux mortalités et aux inhibitions de croissance des pucerons intoxiqués. Cette méthode d'analyse présente l'intérêt de bien visualiser les différentes classes de lectines, et donc de permettre une comparaison des effets toxiques de chacune d'entre elles. Les données utilisées sont :

- la mortalité des pucerons à J1, J3 et J7, pour chacune des trois concentrations de lectines testées (a = 10 µg.ml^{-1} ; b = 50 µg.ml^{-1} ; c = 250 µg.ml^{-1}) ; neuf variables sont donc définies (la variable notée md3b se rapporte par exemple à la mortalité au troisième jour pour la concentration de 50 µg.ml^{-1}). Le facteur temps est ainsi inclus dans l'analyse ;

- les inhibitions de croissance engendrées par les trois concentrations a, b et c (variables ICa, ICb et ICc).

Tous les calculs et les figures sont réalisés à l'aide du logiciel ADE 3.6 (Chessel et Dolédec, 1995). Le tableau des données brutes est reporté en annexe 4. L'origine des lectines testées est donnée dans la fiche-protocole N°2.

2.9.2. Comparaisons des taux de survie

Les taux de survie (%) à un jour donné, sont comparés par un test standard de comparaison de pourcentages (loi Hypergéométrique ; n=40 à 60 ; traitement *vs* témoin).

Les concentrations létales 50 sont calculées à partir du logiciel Toxico™ (annexe 5 ; Febvay & Rahbé, 1991). La théorie de ce calcul consiste à linéariser par l'utilisation des probits, la sigmoïde correspondant au pourcentage de mortalité par rapport au logarithme de la concentration (Bliss, 1935). Cette transformation permet notamment de fournir un intervalle de confiance à la CL50. Pour les protéines moins toxiques, il est possible de demander le calcul de la CL20 et de son intervalle de confiance.

2.9.3. Comparaisons des masses moyennes

Dans un premier temps, les masses moyennes des pucerons de chacune des boîtes d'une modalité donnée sont comparées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA - StatView 4©, Abacus, Inc., USA) pour déceler un éventuel "effet boîte"[46]. Un test de comparaison des moyennes *a posteriori* (Test de Bonferroni/Dunn - SuperANOVA©, Abacus, Inc., USA) permet éventuellement de supprimer une boîte de l'analyse.

Les masses moyennes de chaque modalité sont ensuite comparées (ANOVA, test de Bonferroni/Dunn) pour mettre en évidence l'effet des différentes concentrations de lectines. Ces mêmes tests statistiques sont appliqués pour comparer les variables se rapportant à la croissance dans les tests à long terme sur milieux artificiels ou plantes transgéniques.

Dans certains cas, afin de comparer les effets de lectines qui sont testées dans des expériences indépendantes, les masses des pucerons de chaque série de tests sont transformées en pourcentage par rapport à la masse moyenne des pucerons sur milieux témoins. Les masses individuelles (exprimées en µg ou en pourcentage par rapport au témoin) sont ensuite ajustées par régression linéaire (masse = A.Log(concentration) + B), ou par régression non-linéaire avec un modèle de Michaelis-Menten (fiche-protocole N°11).

Le choix de l'un ou l'autre des modèles s'effectue en comparant les coefficients de régression (R^2). Les ajustements non linéaires sont réalisés avec le logiciel AjustNonLin (Bonnot et Febvay, 1992). Lorsque la croissance est stimulée par le traitement (cas de certaines lectines à très faibles doses), le point correspondant n'est pas pris en compte pour l'ajustement. Les IC50 et les IC20 sont ensuite déduites des ajustements obtenus (fiche-protocole N°11).

2.9.4. Calculs et comparaisons des r_m

Les taux intrinsèques d'accroissement des populations de pucerons (= pucerons d'une modalité) de chacun des tests de fécondité (sur milieux artificiels ou plantes transgéniques) sont calculés par la méthode de Birch (1948). Le principe de ce calcul est détaillé dans la fiche-protocole N°12. La variance de chacun de ces r_m globaux est estimée par la méthode du Jackknife (fiche-protocole N°13 ; Miller, 1974 ; Efron, 1982). Les r_m de chaque individu d'une population sont également calculés (= r_m individuels). Un test de Mann-Whitney ou un test de Kruskal-Wallis appliqué sur ces r_m individuels, permet de comparer les r_m globaux de chacune des modalités testées (ces tests ne nécessitent pas que nous calculions la moyenne des r_m individuels). Dans les cas où nous comparons plus de deux modalités et que l'hypothèse d'égalité de leurs r_m est rejetée, la procédure de Conover (1980) est appliquée pour comparer deux à deux ces r_m et déterminer ceux qui diffèrent les uns des autres.

Les r_m sont aussi estimés par la méthode simplifiée de Wyatt & White (1977) qui donne : $r_m = 0,738.\ln(Md)/d$, avec d = durée moyenne (en jours) entre la naissance des pucerons et le moment où ils commencent à pondre (période pré-reproductive), et Md = nombre moyen de larves pondues pendant une période de durée égale à d. Cette méthode présente l'avantage d'être moins contraignante en temps (la durée du test ne dépasse pas 20 jours, contre 30 à 40 pour le calcul par la méthode de Birch), et surtout d'être moins contraignante en main-d'oeuvre (elle ne nécessite pas un relevé quotidien). Elle minimise également les risques de perturber les adultes et de blesser les plantes, et donc d'introduire un artefact inévaluable dans les résultats finaux. La validité de cette méthode simplifiée est estimée pour juger de la pertinence de son utilisation pour des tests rapides sur un grand nombre de plantes transgéniques.

---

[46] Dans certaines boîtes, des pucerons stressés peuvent par exemple émettre des phéromones d'alarme et perturber l'alimentation des autres pucerons. L'"effet boîte" se traduit par une population d'adultes de tailles homogènes mais plus petites que dans les autres boîtes. Dans l'ensemble, nous l'observons assez rarement et surtout dans des conditions expérimentales limites (dépôt rapide des larves dans les grandes séries, effectif initial de larves limité obligeant à inclure les individus éventuellement stressés par la manipulation, etc.)

Deux autres paramètres populationnels sont utilisés dans notre analyse :

-1) la durée moyenne d'une génération. Elle est calculée par l'équation de Wyatt & White (1977) : $T = d / 0,738$;

-2) la durée nécessaire à une population pour doubler sa taille. Elle est déduite de l'équation de Birch : $DT = \ln(2) / r_m$.

2.9.5. Comparaisons des variables "fécondité" - Modélisation de la dynamique de ponte

Les variables se rapportant à la fécondité (durée de la période reproductive (Dr), nombre total de larves pondues par femelle (Lv), rapports Lv/Dv et Lv/Dr) sont comparés par un test de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. Les comparaisons *a posteriori* des moyennes sont effectuées par la procédure de Conover (1980).

Les données correspondant au nombre total de larves pondues quotidiennement rapporté au nombre d'adultes initialement transférés dans les boîtes individuelles sont représentées graphiquement. Elles sont ajustées avec le logiciel AjustNonLin (Bonnot et Febvay, 1992) par un modèle de compartimentation à trois paramètres défini par l'équation :

$$y = P_3^2 . P_1 . (x - P_2) . e^{-P_3 . (x - P_2)}$$

où P_1 correspond au nombre total calculé de larves pondues par puceron ; P_2 est égal à la durée théorique de la période pré-reproductive définie précédemment ; et P_3 représente une mesure de la vitesse de maturation des embryons. La fiche-protocole N°14A développe le calcul permettant d'aboutir à cette équation. Le choix de ce modèle, plutôt que d'autres modèles décrits dans la littérature, est argumenté dans la fiche- protocole N°14B.

3. Résultats

3.1. Effets des lectines induits par ingestion sur milieux artificiels

3.1.1. Tests de toxicité aiguë

3.1.1.1. Étude préliminaire sur *A. pisum* justifiant notre étude sur la ConA et la GNA

Nous avons exécuté une **analyse en composantes principales** (ACP) normée classique sur le tableau 27 (lectines) x 12 (variables liées à la mortalité ou à la croissance)[47]. Les effets de ces vingt-sept lectines correspondent à des doses comprises entre 10 et 250 µg.ml^{-1}. En fait, vingt-huit lectines devraient apparaître dans nos résultats, mais la lectine d'*Amaranthus caudatus* L. (ACA) a été supprimée de l'analyse. Des calculs préliminaires prenant en compte cette lectine montrent que le premier facteur est principalement induit par celle-ci, ce qui gêne l'étude du reste des lectines. L'ACA se distingue de ces dernières en induisant dès les premiers

47 Données brutes en annexe 5.

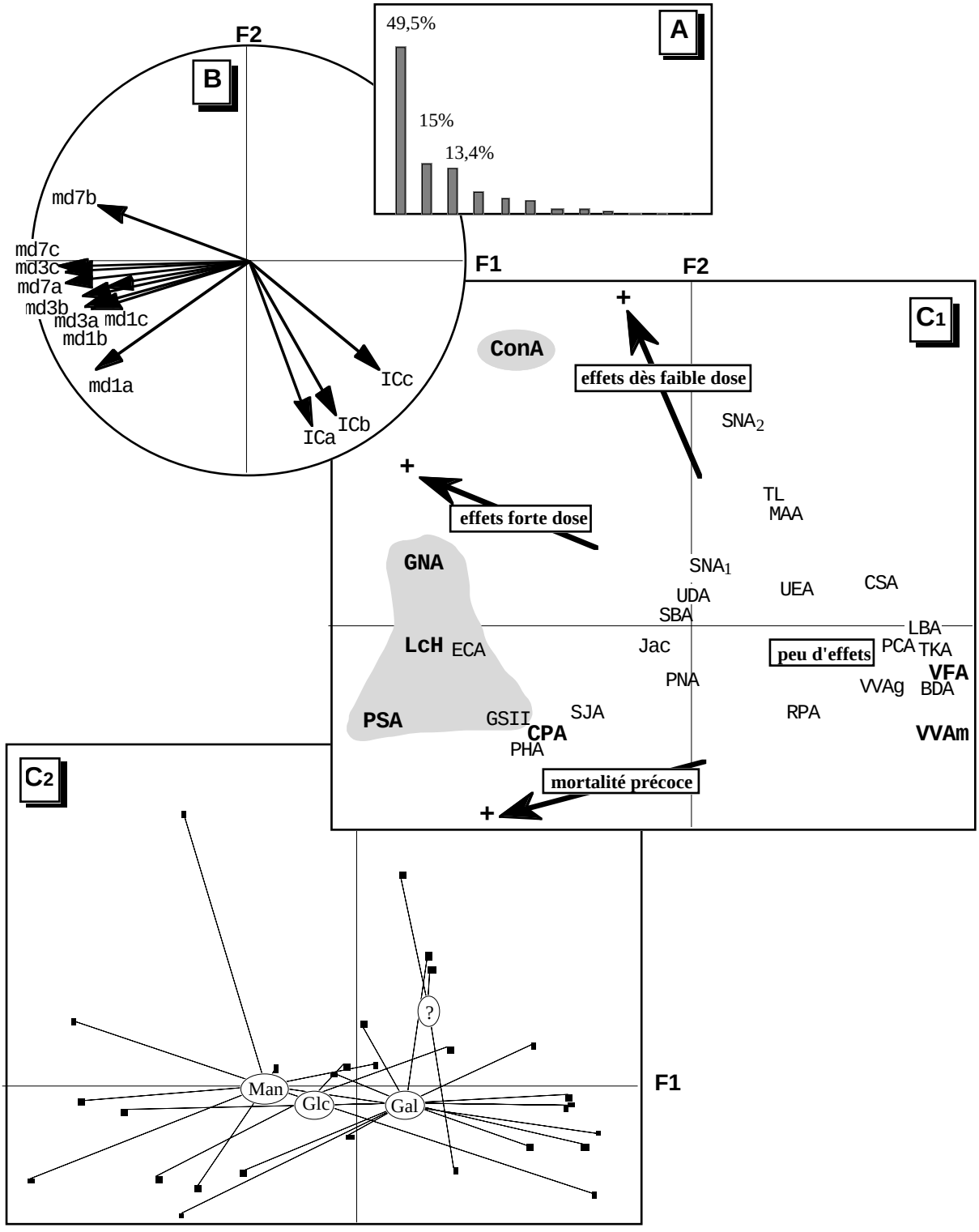


Figure 9 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs de l'ACP normée se rapportant au tableau 27 (lectines) x 12 (variables : "mortalité" et "inhibition de croissance").

***A** - Diagramme des valeurs propres ; **B** - Cercle des corrélations variables-facteurs ; **C1** - Plan factoriel F1-F2 des lectines ; **C2** - Carte factorielle identique à C1 : représentation des centres de gravité par classe de lectines et liaisons classe-points (Man : classe des lectines à Man-Glc ; Glc : lectines à GlcNAc-Glc ; Gal : lectines à GalNAc ; ? : autres classes de lectines).*

jours du test une très forte mortalité même à moyenne dose (50 µg.ml^{-1}). C'est donc une lectine très intéressante de par ses effets atypiques.

La figure 9 rassemble le diagramme des **valeurs propres**, le **cercle des corrélations** variables-facteurs (plan F1-F2) et les **cartes factorielles** des vingt-sept lectines (plan F1-F2) issus de cette analyse.

Près de 50 % de la variabilité totale est portée par l'axe 1 et 78 % par les trois premiers axes. Le cercle des corrélations F1-F2 met clairement en évidence la redondance importante de certaines variables, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de leur définition, mais permet de définir cinq groupes. L'analyse de la matrice des corrélations permet par ailleurs de rendre compte de cette redondance (donnée non montrée) : elle indique logiquement des corrélations positives (>0,70) entre les mortalités relevées à deux intervalles de temps successifs pour une même concentration (par exemple md3c et md7c sont fortement corrélées). Les douze variables permettent cependant une analyse un peu plus fine (trois axes factoriels informatifs) que la prise en compte unique des CL50 et IC50.

L'interprétation du cercle des corrélations et des cartes factorielles est rendue possible grâce à la statistique d'inertie : les variables "mortalités" en particulier md3a, md3b, md3c et md7c contribuent essentiellement à la définition de l'**axe 1**. Celui-ci traduit parfaitement l'effet majeur de "toxicité générale" et la **corrélation négative** entre la **mortalité** et la **croissance** (figure 9B).

Ce premier axe prend en compte principalement deux groupes de lectines opposés sur la carte factorielle C1 : un groupe rassemblant les lectines GNA, LcH, ECA, PSA, GSII, CPA et SJA ; un second qui comprend les protéines UEA, VVAg, VVAm, VFA, PCA, LBA, TKA, BDA et CSA. Ce dernier groupe inclut des lectines n'induisant aucun effet toxique (mortalité ou croissance), même à long terme et à forte dose. Le premier groupe doit être considéré avec attention. La lecture de la carte factorielle C1 aurait tendance à nous amener à conclure que les lectines GSII et CPA, par exemple, présentent les mêmes propriétés aphidotoxiques. Or la statique d'inertie nous montre que leurs coordonnées sur la carte factorielle sont quasi-identiques uniquement du fait de mortalités comparables, observées dès les premiers jours quelles que soient les concentrations. Mais seule la GSII qui induit une forte inhibition de croissance à la dose de 250 µg.ml^{-1} présente pour nous de l'intérêt. Cette observation s'applique aussi aux lectines SJA et PHA qui se révèlent donc peu intéressantes en terme de toxicité vis à vis des pucerons.

Le **second axe** prend en compte les variables "inhibition de croissance" notamment à faibles doses et quatre lectines : ConA, SNA2, TL et MAA. Elles **induisent un effet sur la croissance dès les faibles doses.** Cette observation s'applique principalement à la ConA et dans une moindre mesure à la MAA. Les effets induits par SNA2 ne seront pas commentés car ils sont peut-être biaisés par la présence d'une altération des milieux en fin d'expérience. La SNA1 s'avère d'ailleurs peu active. Les résultats obtenus avec la lectine de la tulipe (TL) sont difficilement interprétables : forte inhibition de la croissance aux concentrations a et c, faible inhibition à la concentration b (pas d'effet-dose clair).

Le **troisième axe** prend en compte les lectines SNA1, UDA et RPA. L'information qu'il porte s'avère peu intéressante pour l'interprétation de nos résultats : il distingue les lectines pour lesquelles les mortalités à un jour donné (dj), diffèrent fortement entre les concentrations a et c (mdja>mdjc ou inversement).

L'interprétation globale des informations portées par les deux premiers axes nous amène à distinguer (en ombré sur la figure 9C1), et en plus de la lectine de l'amaranthe :

- la **ConA** dont les effets sur la croissance (mais non sur la mortalité) se manifestent dès les faibles doses,

- la PSA, la **GNA**, la GSII, l'ECA et la LcH (dans l'ordre décroissant de la valeur de la variable ICc) dont les effets se manifestent par une mortalité importante dès les premiers

jours, même à la dose moyenne de 50 µg.ml^{-1}, et une forte inhibition de croissance. Comme avec la ConA, l'inhibition de croissance induite par la GNA à dose moyenne est déjà élevée alors qu'à cette dose les autres lectines sont moins actives. Les caractéristiques toxicologiques de la ConA et de la GNA sont résumées :

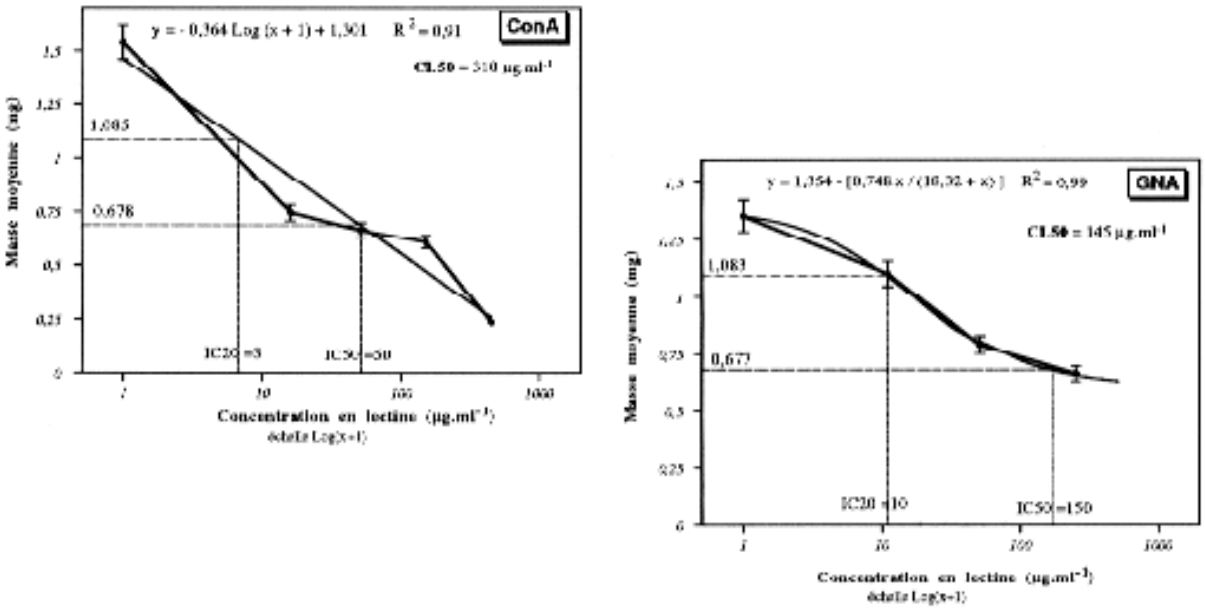


Figure 10 – Effets de deux lectines à mannose , la Concanavaline A et la lectine du perce-neige (GNA) sur la croissance du puceron Acyrtosiphon pisum.

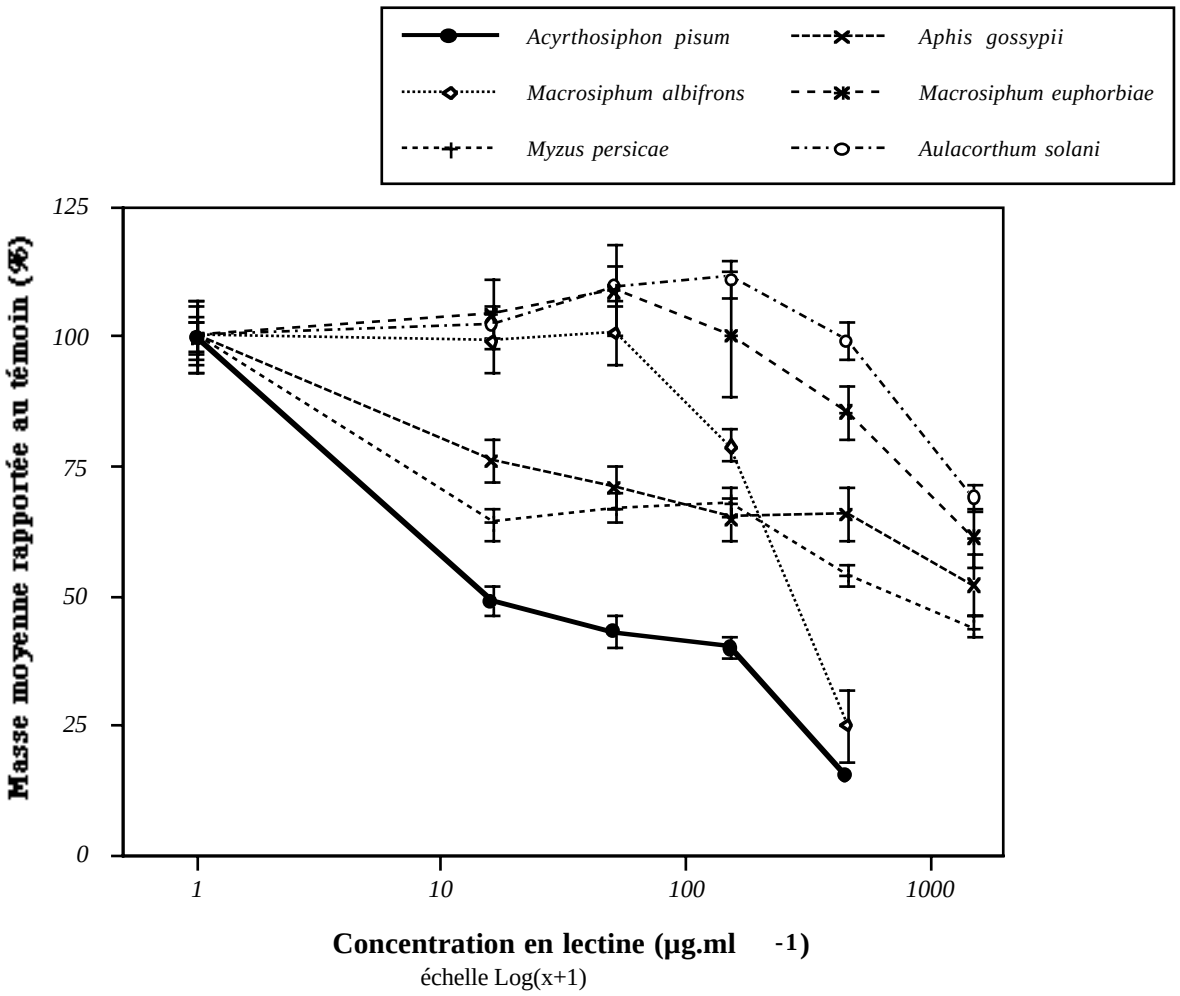
Chaque point correpond à la masse moyenne calculée (± SE) pour une concentration définie. Les données sont ajustée par l'équation indiquée sur la figure. Les IC20 et les IC50 sont notées (en µg.ml^{-1}) ainsi que les CL50.

Nous avons représenté sur la carte factorielle C2 (figure 9C2) les centres de gravité des classes de lectines et les liaisons classes-points : cette représentation permet une bonne visualisation des différences existant entre les lectines d'une même spécificité osidique. Les graphes C1 et C2 sont superposables.

3.1.1.2. Effets de la Concanavaline A sur six espèces de pucerons

La figure 11 illustre les effets de la Concanavaline A sur la croissance de six espèces de pucerons à des concentrations comprises entre 10 µg.ml^{-1} et 1500 µg.ml^{-1} (n = 5 répétitions de 20 pucerons par concentration testée). Afin de faciliter la comparaison entre ces espèces de tailles très différentes, les masses moyennes sont exprimées en pourcentage par rapport à celles des pucerons témoins. Les masses, et respectivement les mortalités des pucerons témoins au jour J7 sont : 1,540 mg pour *A. pisum* (5 % de mortalité) ; 2,200 mg pour *M. albifrons* (4 % de mortalité) ; 0,235 mg pour *M. persicae* (2 % de mortalité) ; 0,127 mg pour *A. gossypii* (10 % de mortalité) ; 0,239 mg pour *M. euphorbiae* (10 % de mortalité) ; 0,343 mg pour *A. solani* (4 % de mortalité).

Les CL20 et les CL50 sont évaluées pour ces six espèces. La ConA s'avère létale à faibles concentrations pour *A. pisum* et *M. albifrons* : leurs CL50 sont respectivement de l'ordre de 310 µg.ml^{-1} (intervalle de confiance 230-390) et 330 µg.ml^{-1} (intervalle de confiance 280-380). Pour *M. persicae*, *M. euphorbiae* et *A. solani*, les valeurs des CL50 excèdent 1500 µg.ml^{-1} (leurs taux de mortalité respectifs à cette concentration sont 15, 25 et 0 %) alors que la CL50 pour *A. gossypii* est évaluée à 1200 µg.ml^{-1} (65 % de mortalité à la concentration de 1500 µg.ml^{-1}).



	Ajustement	R^2	IC20	IC50	CL20	CL50
A. pisum	logarithmique	0,94	3	33	<15*	310
M. albifrons	linéaire	0,99	140	310	180	330
M. persicae	logarithmique	0,81	10	440	nl	nl
A. gossypii	logarithmique	0,95	17	>1500	nl	1200
M. euphorbiae	linéaire	0,93	830	>1500	nl	nl
A. solani	linéaire	0,84	1070	>1500	nl	nl

* Même à la dose la plus faible (15 µg.ml^{-1}), plus de 20% des pucerons sont morts à J+7
nl : ConA non létale même à la plus forte dose (1500 µg.ml^{-1})

Figure 11 - Effets de la Concanavaline A sur la croissance de six espèces de pucerons.

Les masses moyennes (±SE) sont rapportées à la masse moyenne du témoin (%). L'ajustement des données par un modèle linéaire ou logarithmique (choix fonction de la valeur du coefficient de corrélation) permet le calcul des IC20 et IC50. Les CL20 et CL50 sont aussi données quand le calcul est possible.

3.1.1.3. Effets de lectines à mannose sur la survie et la croissance des larves de *M. persicae*

Des larves de *M. persicae* ont été intoxiquées par quatre lectines à mannose/glucose (ConA, GNA, NPA et ASA), à des concentrations comprises entre 10 µg.ml^{-1} à 1500 µg.ml^{-1}, pendant une période de 8 jours (n = 5 répétitions de 20 pucerons par concentration testée, exceptée pour la plus forte concentration n = 3 x 20). Cette durée correspond au temps normal de développement des larves jusqu'à l'âge adulte. Les lectines de *Rhizoctonia solani* (RSA) et de *Maackia* (MAA)[48] ont été testées comme lectines témoins. Aucun effet sur la survie, quelle que soit la dose, n'est observé avec l'une ou l'autre de ces deux lectines. Il n'y a pas non plus d'effets significatifs sur la croissance, excepté pour la RSA à la plus forte concentration (1500 µg.ml^{-1}) pour laquelle l'inhibition de croissance est de 43 % (figure 14).

Simultanément à ce test, des larves de *M. persicae* ont été intoxiquées par deux inhibiteurs enzymatiques, la serpine du niébé (CpTI) et un inhibiteur α-amylase du blé (WAI). La première est très toxique vis à vis des coléoptères, en particulier *C. maculatus* (Gatehouse et Boulter, 1983), la seconde induit des effets délétères à fortes concentrations sur *A. pisum* (Rahbé et Febvay, 1993). Nos collègues britanniques travaillent sur ces deux inhibiteurs dans l'optique de créer des plantes transgéniques résistantes aux insectes, et les constructions géniques correspondantes leur sont disponibles. En complément des tests avec les lectines, il était donc intéressant d'observer les effets induits *in vitro* par ces polypeptides sur *M. persicae,* avant d'envisager de tester cette espèce sur des plantes transformées.

Durant les premiers jours de développement des larves, les quatre lectines à mannose-glucose n'induisent aucun effet significatif sur la **survie** :

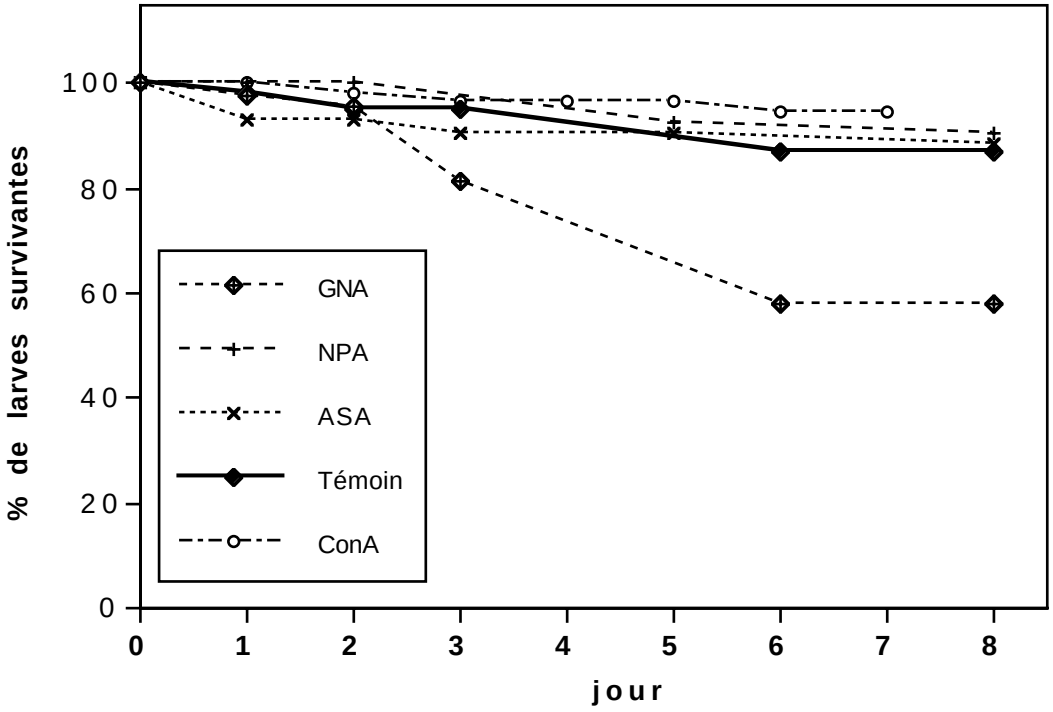


Figure 12 - Taux de survie des larves de l'espèce Myzus persicae *sur des milieux artificiels contenant 1500 µg.ml-1 de lectine du perce-neige,* Galanthus nivalis *(GNA), de lectine de la jonquille,* Narcissus pseudonarcissus *(NPA), de lectine de l'ail* Allium sativum *(ASA) ou de lectine de* Canavalia ensiformis *(ConA).*

Au jour J3, la plus forte concentration de GNA (1500 µg.ml^{-1}) commence à affecter significativement la survie (-19 % ; p = 0,02). Au 8ème jour, à cette même concentration, elle est réduite à 58 %, alors que celle des larves sur milieux témoins s'élève à 88 %. Ainsi,

[48] Lectines se fixant spécifiquement à la N-acétylgalactosamine (GalNAc) - tableau 6.

comparée au témoin, la GNA induit une baisse significative de la survie de 34 % pendant la durée du développement des larves jusqu'à l'âge adulte ($p < 0,001$). Aucune des autres protéines testées (lectines ou inhibiteurs de protéases) n'est significativement létale pour les larves de *M. persicae* dans la gamme de concentration explorée.

Les effets des protéines purifiées sur le **développement** sont exprimés en terme de masse acquise (gain) au cours de la période larvaire, comparée à celle des pucerons sur milieux témoins (figures 13 & 14). Les trois lectines à mannose strict (GNA, NPA, ASA) induisent une augmentation significative de la masse à la plus faible concentration testée (10 $\mu g.ml^{-1}$; ANOVA, test de comparaison *a posteriori* des moyennes par un test de Bonferroni-Dunn).

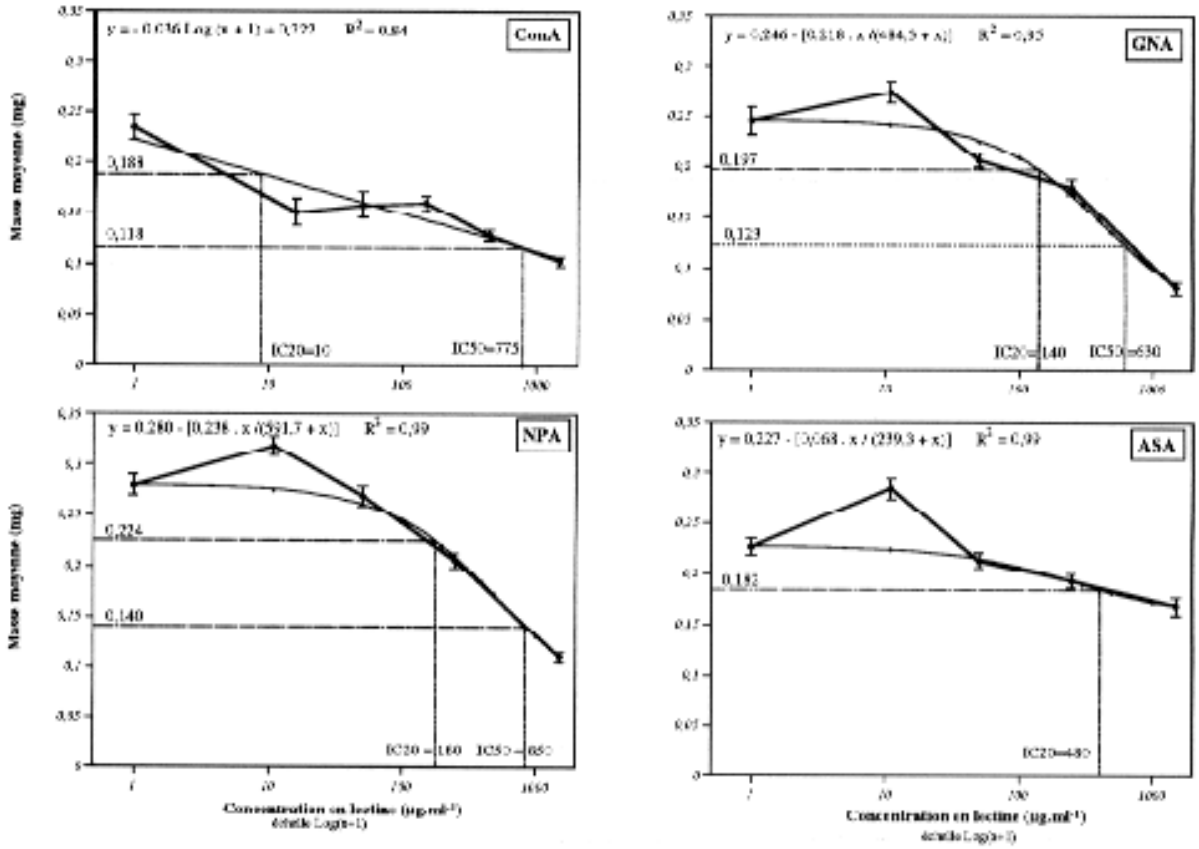


Figure 13 – Effets de quatre lectines à mannose sur la croissance du puceron du pêcher, Myzus persicae *(voir le texte pour la signification des abréviations et les calculs d'ajustement des données).*

Cet effet n'est pas observé avec la ConA, ni dans le présent test avec *M. persicae*, ni dans le précédent test avec les différentes espèces aphidiennes. Ces effets ne sont pas non plus observables avec la RSA, la MAA et les deux inhibiteurs de protéases (figure 14).

Aux fortes concentrations, toutes les protéines (exceptée MAA) entraînent des effets délétères au niveau de la croissance. Ceux-ci sont statistiquement significatifs pour les quatre lectines à mannose/glucose à la concentration de 250 $\mu g.ml^{-1}$ et plus ($p < 0,009$). La ConA et la GNA commencent même à être actives dès la concentration de 50 $\mu g.ml^{-1}$ ($p < 0,05$). A l'exception de l'ASA et de WAI qui n'induisent des effets sur la croissance qu'à la plus forte dose testée, et de la MAA qui est ici totalement inactive, il est possible de calculer les valeurs des IC50 pour toutes les autres protéines (figures 13 & 14). Ces valeurs estimées sont en particulier pour ConA, GNA et NPA respectivement 774, 628 et 848 $\mu g.ml^{-1}$ (7,3 µM, 12,5 µM et 23 µM sur la base des oligomères natifs). Les IC20 sont estimées à environ 10,

141, 182 et 478 µg.ml^{-1} pour ConA, GNA, NPA et ASA (0,1 µM, 2,8 µM, 4,9 µM, 20 µM de protéine native).

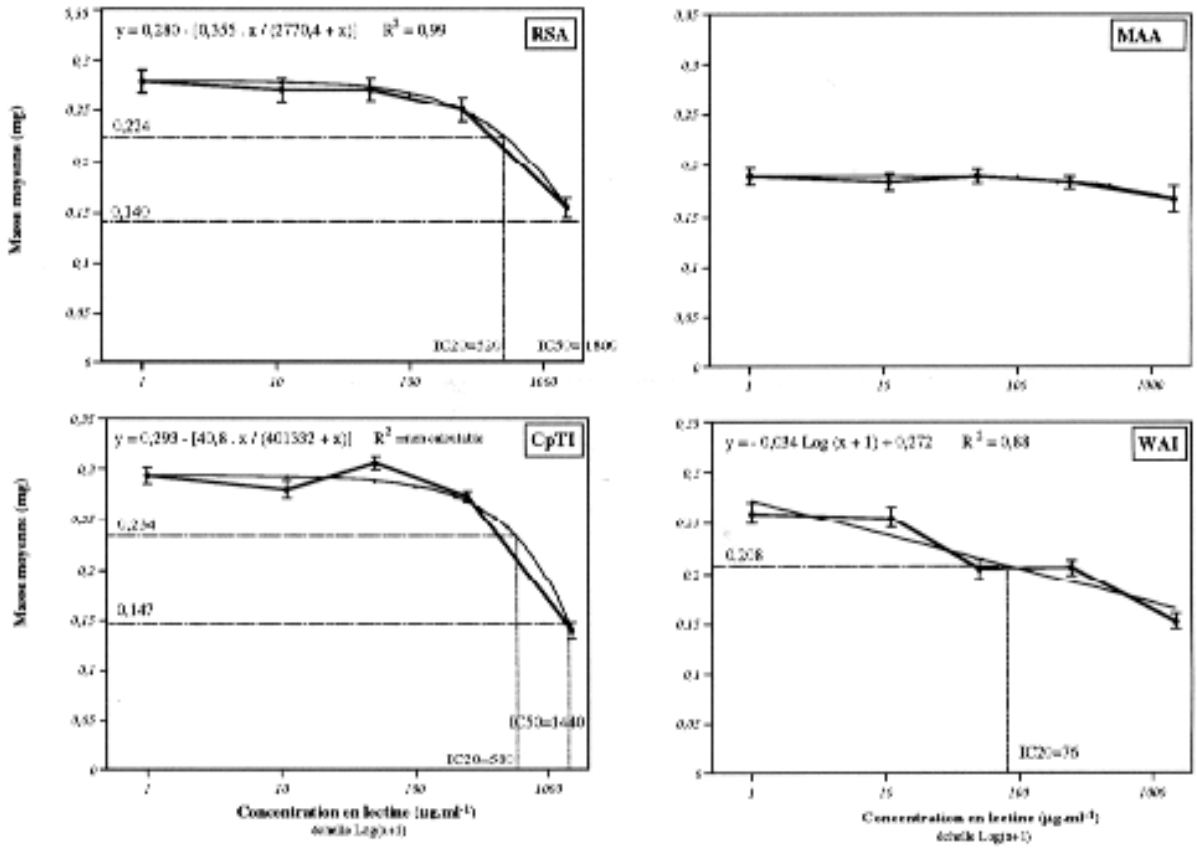


Figure 14 – Effets de deux lectines (RSA, MAA) et deux inhibiteurs de protéases (CpTI, WAI) sur la croissance du puceron du pêcher, Myzus persicae *(voir le texte pour la signification des abréviations et les calculs d'ajustement des données).*

3.1.2. Effets à long terme de doses sublétales

3.1.2.1 - Effets de concentrations sublétales de ConA sur la croissance et la fécondité d'*A. pisum*

Les précédents tests d'intoxication aiguë démontrent les propriétés aphidotoxiques de la Concanavaline A vis à vis d'*A. pisum*. Nous avons aussi observé les effets de cette lectine sur la fécondité.

Des larves ont été intoxiquées à des doses induisant une faible mortalité (doses sublétales) pour permettre cette observation à long terme (d'une durée correspondante à la durée de vie d'une génération : développement larvaire + vie adulte = 30-35 jours).

Un premier test a été réalisé avec une dose de 80 µg.ml^{-1}, une dose supposée induire une inhibition de croissance comprise entre l'IC20 et l'IC50. Cette estimation est relativement imprécise car il existe une variabilité de la réponse du clone LL01 aux différents tests d'intoxication aiguë que nous lui avons fait subir. Ce premier test sur la fécondité avec la dose de ConA à 80 µg.ml^{-1} confirme cette variabilité puisqu'à l'issue des 8 jours de développement (J7) l'inhibition de croissance observée n'est que de 10 % (tableau 8). Le test a cependant été

poursuivi avec cette dose puis recommencé avec deux autres doses (100 µg.ml^{-1} et 200 µg.ml^{-1}) induisant respectivement des inhibitions de croissance d'environ 50 et 60 %[49].

Le tableau 8 résume les performances des larves d'une part et des adultes d'autre part, intoxiqués aux trois concentrations de ConA. Les courbes de survie et de fécondité sont décrites dans la figure 15.

La masse moyenne des jeunes adultes à J7 sur milieux témoins et leurs durées de vie moyenne ne sont pas significativement différentes d'un test à l'autre, laissant penser que ces deux lots de pucerons sont identiques. En réalité il n'en est rien. La figure 15B et surtout la figure 15C, ainsi que les estimations des r_m montrent que le lot de pucerons du deuxième test est moins "performant" que celui du premier test. Cette observation rejoint celle faite précédemment concernant la variabilité des résultats obtenus sur milieux artificiels. Cette variabilité montre la nécessité de bien constituer ses lots de pucerons témoins (randomnisation) pour diminuer au maximum ce que l'on pourrait appeler l'"effet puceron" (influence maternelle sur les performances des pucerons, bien connue des aphidologistes). Elle impliquera ici que nous n'analyserons pas globalement, mais "parallèlement" les résultats des deux tests.

Seules les masses des adultes du deuxième test sont relevées au jour J15 (correspondant approximativement à la moitié de la période reproductive du lot témoin). La **"croissance"** des adultes s'avère beaucoup **plus importante sur les milieux lectines** (+ 104 % et + 107 % pour les deux concentrations de ConA - 6,6 % pour les pucerons sur milieux témoins). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de croissance observée à la fin du stade larvaire est compensée au cours de la vie adulte. La comparaison des masses à J15 conduirait même à conclure que les pucerons sur milieux lectines sont capables de rattraper complètement leur retard de croissance (pas de différence significative à J15 entre les masses moyennes des pucerons sur milieux lectines et celles des pucerons sur milieux témoins , $p > 0,05$). Mais ces résultats sont à analyser avec prudence : la comparaison entre les trois modalités n'est possible qu'en tenant compte du nombre de larves déjà pondues au moment où les adultes sont pesés. En effet, à J15, les pucerons sur milieux témoins sont en phase décroissante de leur ponte, alors que les adultes sur milieux lectines présentent leurs pics de fécondité. Les pucerons commencent à pondre avec environ 1 jour, 3 jours, et 4 jours de retard sur milieux ConA80, ConA100 et ConA200 respectivement (tableau 8, variable d), ce qui se traduit par un décalage des pics de fécondité calculés par les ajustements (figure 15C). Les contenus embryonnaires de ces trois lots d'aphides au jour J15 sont donc très différents et la masse globale d'un puceron adulte dépend éminemment de ce contenu embryonnaire : au moment de son pic de fécondité notamment, il est alourdi par des embryons arrivés à maturité. Une comparaison des masses des pucerons de chaque modalité pesés au même stade de reproduction (pic de fécondité ou fin de période reproductive) nous aurait vraisemblablement montré que les pucerons intoxiqués ne compensent que partiellement leur inhibition de croissance au jour J7. Il faut noter que le problème du résultat du groupe témoin de la deuxième expérience peut avoir minimisé l'effet de la ConA. Ce groupe (et lui seul sur les cinq) a présenté une mortalité pré-reproductive (et larvaire, voir tableau 8) anormale, et que nous n'expliquons pas (11 individus ont du être retirés de l'analyse pour mortalité ou ponte nulle). Les résultats avec *M. persicae* où deux groupes témoins avaient aussi été réalisés, sont beaucoup plus homogènes, soulignant le caractère atypique de la variabilité observée ici.

Il peut paraître paradoxal de constater que l'**intoxication** se traduit par une **longévité accrue** des pucerons. Dès le jour J20, la mortalité est significativement plus grande sur les milieux témoins (45 %) comparées à celles des pucerons sur milieux lectines au cours de l'une ou l'autre des deux expériences (ConA80 : 22 % ; ConA100 ou 200 : 0 %).

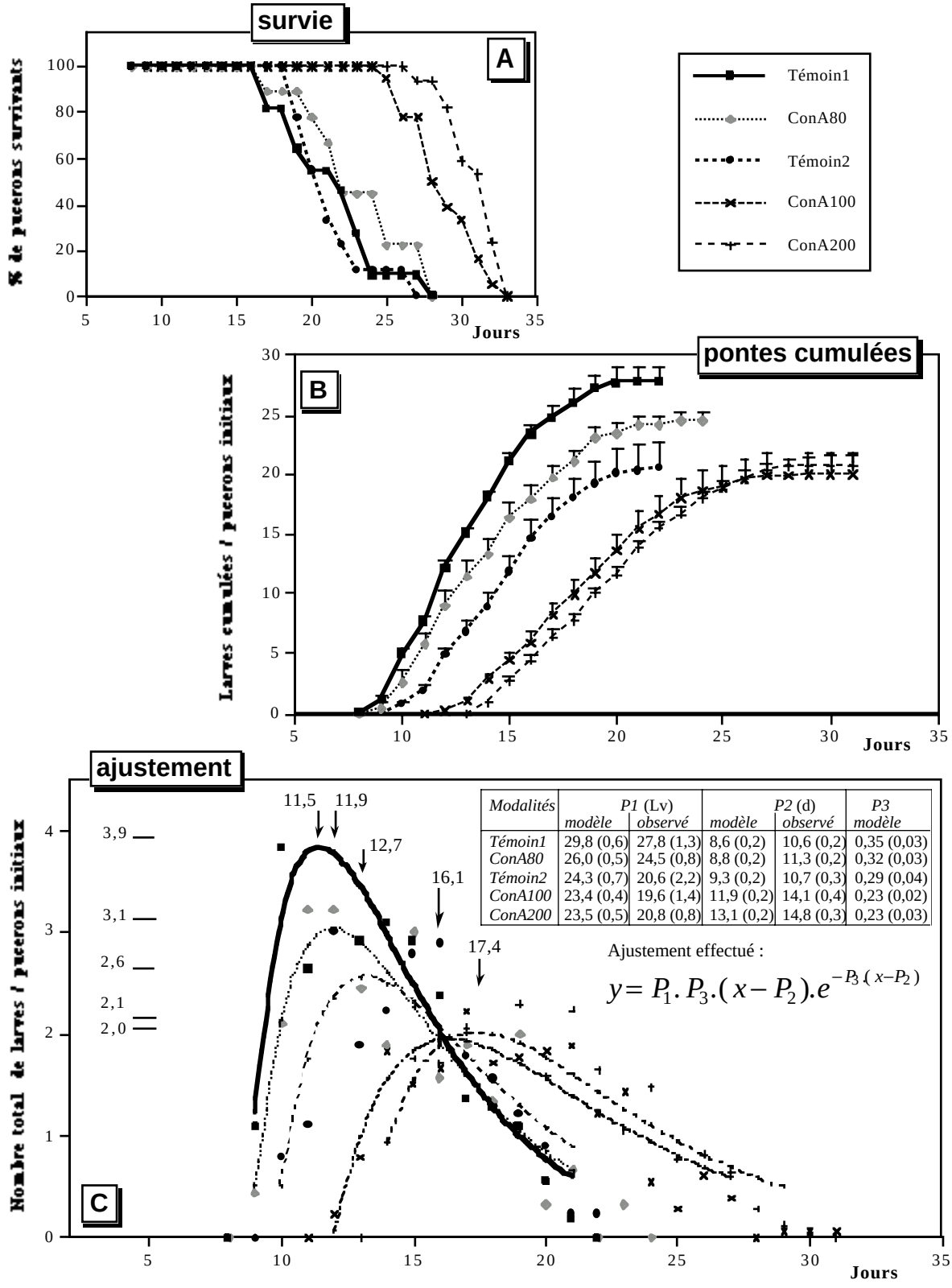
De même la période reproductive des adultes (Dv) de la modalité ConA200 est plus longue de deux jours (*vs* témoins) ce qui leur permet de pondre finalement autant de larves (Lv) que

[49] Les larves néonates ont été déposées sur des milieux contenant des concentrations de ConA comprises entre entre 50 et 600 µg.ml^{-1}. A J7, les deux lots de larves ayant subi les effets recherchés (inhibition de croissance de 50 % et de 60 %) ont été conservés pour la suite du test (matériels & méthodes).

Modalités			Témoin	ConA$_{80}$	Témoin	ConA$_{100}$	ConA$_{200}$
Concentration en lectine (µg.ml^{-1})			0	80	0	100	200
Effets sur les larves	♦ mortalité à J_7		3 %	7 %	25 %	28 %	37 %
	♦ nombre de pucerons inclus dans l'analyse ultérieure		11	9	9	19	17
	♦ masse moyenne à J_7 (µg)		1461 (70) **a**	1310 (92) **a**	1450 (52) **a**	739 (23) **b**	565 (22) **c**
	♦ masse rapportée au témoin à J7		100	90	100	51	39
Effets sur les adultes	*Survie*	♦ **Dv** : durée de vie moyenne (j)	20,5 (1,0)	22,1 (1,2)	19,3 (0,8) **a**	26,5 (0,7) **b**	29,1 (0,4) **c**
		♦ mortalité des adultes à J_{20}	45 %	22 %	45 %	0 %	0 %
	Croissance	♦ **d** : durée de la période pré-reproductive	10,6 (0,2) **a**	11,3 (0,2) **b**	10,7 (0,3) **a**	14,1 (0,4) **c**	14,8 (0,3) **c**
		♦ masse moyenne à J_{15}	-	-	1359 (101) **ab**	1487 (67) **b**	1154 (34) **a**
		♦ masse rapportée au témoin à J_{15} (%)	-	-	100	109	85
		♦ différence de masse de J_7 à J_{15}	-	-	- 6,6 %	+ 104 %	+ 107 %
	Fécondité	♦ **Dr** : durée de la période reproductive	9,4 (0,5)	9,9 (0,5)	9,2 (0,4) **a**	9,5 (0,6) **a**	11,5 (0,6) **b**
		♦ **Lv** : nombre de larves pondues /puceron	27,8 (1,3) **a**	24,5 (0,8) **b**	20,6 (2,2)	19,6 (1,4)	20,8 (0,8)
		♦ Lv/Dv	2,14 (0,13) **a**	1,71 (0,15) **b**	1,69 (0,18) **a'**	1,01 (0,07) **b'**	0,95 (0,04) **b'**
		♦ Lv/Dr	2,99 (0,11) **a**	2,51 (0,13) **b**	2,19 (0,16) **a'**	2,05 (0,06) **a'**	1,83 (0,05) **b'**
		♦ **Md** : larves pondues en une durée égale à d	24,8 (1,3)	24,1 (0,9)	20,1 (2,0)	20,0 (1,4)	20,5 (0,7)
		♦ **DT** : durée pour doubler la taille de la population	2,61	2,86	3,27	4,10	4,33
	Taux intrinsèque d'accroissement naturel, r_m *(*SD_{jack}*) :*						
	selon :	♦ Birch (1948)	0,244 (0,003) **a**	0,224 (0,008) **b**	0,212 (0,008) **a'**	0,169 (0,005) **b'**	0,160 (0,004) **b'**
		♦ Wyatt & White (1977)	0,224 (0,005) **a**	0,208 (0,006) **b**	0,206 (0,010) **a'**	0,156 (0,006) **b'**	0,151 (0,004) **b'**

Tableau 8 - Effets de doses sublétales de ConA sur la croissance, la survie, et la fécondité du puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum*.

Les masses sont indiquées en µg, les durées en jours. L'erreur standard (SE) de chaque valeur est donnée entre parenthèses ; sur une même ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes diffèrent significativement au seuil de 5% (voir Matériels & Méthodes pour les tests appliqués). Lorsque les témoins ne diffèrent pas significativement, les valeurs moyennes des 5 modalités sont comparées, sinon chaque expérience est considérée indépendamment. Le jour J15 correspond à la moitié environ de la période reproductive. Le jour J20 correspond au premier jour où une différence significative apparaît au niveau de la mortalité ($p<5\%$).



Modalités	*P1* (Lv) *modèle*	*P1* (Lv) *observé*	*P2* (d) *modèle*	*P2* (d) *observé*	*P3* *modèle*
Témoin1	29,8 (0,6)	27,8 (1,3)	8,6 (0,2)	10,6 (0,2)	0,35 (0,03)
ConA80	26,0 (0,5)	24,5 (0,8)	8,8 (0,2)	11,3 (0,2)	0,32 (0,03)
Témoin2	24,3 (0,7)	20,6 (2,2)	9,3 (0,2)	10,7 (0,3)	0,29 (0,04)
ConA100	23,4 (0,4)	19,6 (1,4)	11,9 (0,2)	14,1 (0,4)	0,23 (0,02)
ConA200	23,5 (0,5)	20,8 (0,8)	13,1 (0,2)	14,8 (0,3)	0,23 (0,03)

Figure 15 - Effets de doses sublétales de la Concanavaline A sur la survie et la fécondité du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* .
(la légende est expliquée dans le texte ; l'erreur standard est reportée pour chaque point de la figure B ; les valeurs des paramètres P1, P2 et P3 (observés ou donnés par le modèle) sont présentées dans le tableau de la figure C - erreurs standards entre parenthèses).

les pucerons peu ou pas intoxiqués (figure 15B et tableau 8). Ces observations expliquent les différences significatives observables pour les rapports Lv/Dv et Lv/Dr (tableau 8). Cependant, compte tenu de la remarque précédente sur le lot témoin du deuxième test et au vu des différences significatives constatées entre les deux modalités du premier test pour la variable Lv (ainsi que ceux de *M. persicae* plus loin), nous ne conclurons pas que les pucerons fortement intoxiqués sont capables de compenser à long terme, au niveau de la fécondité, les effets induits par la lectine en début de croissance.

La **vitesse de croissance** (en terme de croissance des populations) des lots de pucerons testés de chaque modalité est exprimée par le r_m. Comme avec la plupart des précédentes variables, les deux lots témoins ne sont pas comparables (ils diffèrent principalement par leur fécondité totale Lv). Il est intéressant de constater que même une intoxication relativement faible (10 % d'inhibition de croissance à 80 $\mu g.ml^{-1}$) se traduit par un effet significatif sur ce paramètre. Concernant le deuxième test, les différences entre le lot témoin et les lots lectines s'expliquent uniquement par le décalage existant au niveau du premier jour de ponte. En effet, les valeurs de fécondité de ces premiers jours sont déterminantes dans les calculs des r_m (fiche-protocole N° 12).

Si un doublement de la dose de ConA induit des effets significatifs sur la masse des pucerons (J7 ou J15), il n'en est pas de même pour la vitesse de croissance. Dans le cas présent, une intoxication plus forte n'entraîne pas de diminution du nombre de larves pondues (Lv), et les courbes de fécondité sont superposables sur la figure 15C : les r_m des modalités ConA100 et ConA200 sont donc pratiquement identiques.

L'utilisation de l'approximation de Birch ou de la méthode de Wyatt & White pour le calcul des r_m nous amène aux mêmes conclusions concernant les différences observées entre chaque modalité. La méthode de Wyatt & White conduit cependant à une sous-estimation de la valeur des r_m[50].

3.1.2.2. Effets de concentrations sublétales de ConA et de GNA sur la croissance et la fécondité de *M. persicae*

Des tests d'intoxications sublétales ont également été conduits sur le puceron du pêcher, *M. persicae*. Deux tests indépendants, d'une part avec la ConA à la concentration de 140 $\mu g.ml^{-1}$ et d'autre part avec la GNA à 215 $\mu g.ml^{-1}$ et 450 $\mu g.ml^{-1}$, nous permettent de décrire les effets à long terme de ces deux lectines. La concentration de ConA a été choisie de manière à obtenir à J8 une inhibition de la croissance des jeunes adultes de l'ordre de 35 % (inhibition calculée à partir de l'ajustement de la figure 13). Les doses de GNA devaient induire une inhibition de croissance de 30 % et 40 % pour les doses respectives de 215 $\mu g.ml^{-1}$ et 450 $\mu g.ml^{-1}$. Le tableau 9 résume les résultats obtenus.

Les **inhibitions de croissance** induites par les deux doses de GNA sont en adéquation avec les résultats attendus (31 % et 37 % de réduction de la croissance). Par contre, la croissance des pucerons est moins affectée par la ConA que nous nous y attendions (IC observée = 15 % vs 35 % attendu). Cette observation rejoint celles faites sur *A. pisum* : il existe une variabilité des résultats d'intoxication par la ConA. Celle-ci pourrait s'expliquer par :

-1) une hétérogénéité de la matière première (poudre) ;

-2) une interaction toxicité-"effet puceron" (effet maternel tel que nous l'avons défini précédemment).

---

50 Nous supposons que la méthode de Birch permet d'obtenir le meilleur estimé de la valeur du r_m d'une population de pucerons.

En terme d'effets sur la croissance et sur la mortalité des larves, les témoins des deux tests sont identiques. Les données traduisant ces effets sont donc analysées globalement (tableau 9). Par contre, pour certaines variables se rapportant à la fécondité (d, Md, r_m), les deux tests sont considérés indépendamment. Ainsi, le nombre total de larves (Lv) pondues par les pucerons témoins du deuxième test est sensiblement plus faible que celui des pucerons témoins du premier test. De plus, il existe un décalage d'un jour entre les premières pontes de ces deux lots (variable d). Ces deux observations apparaissent clairement sur la figure 16C et se traduisent par des r_m légèrement mais significativement différents.

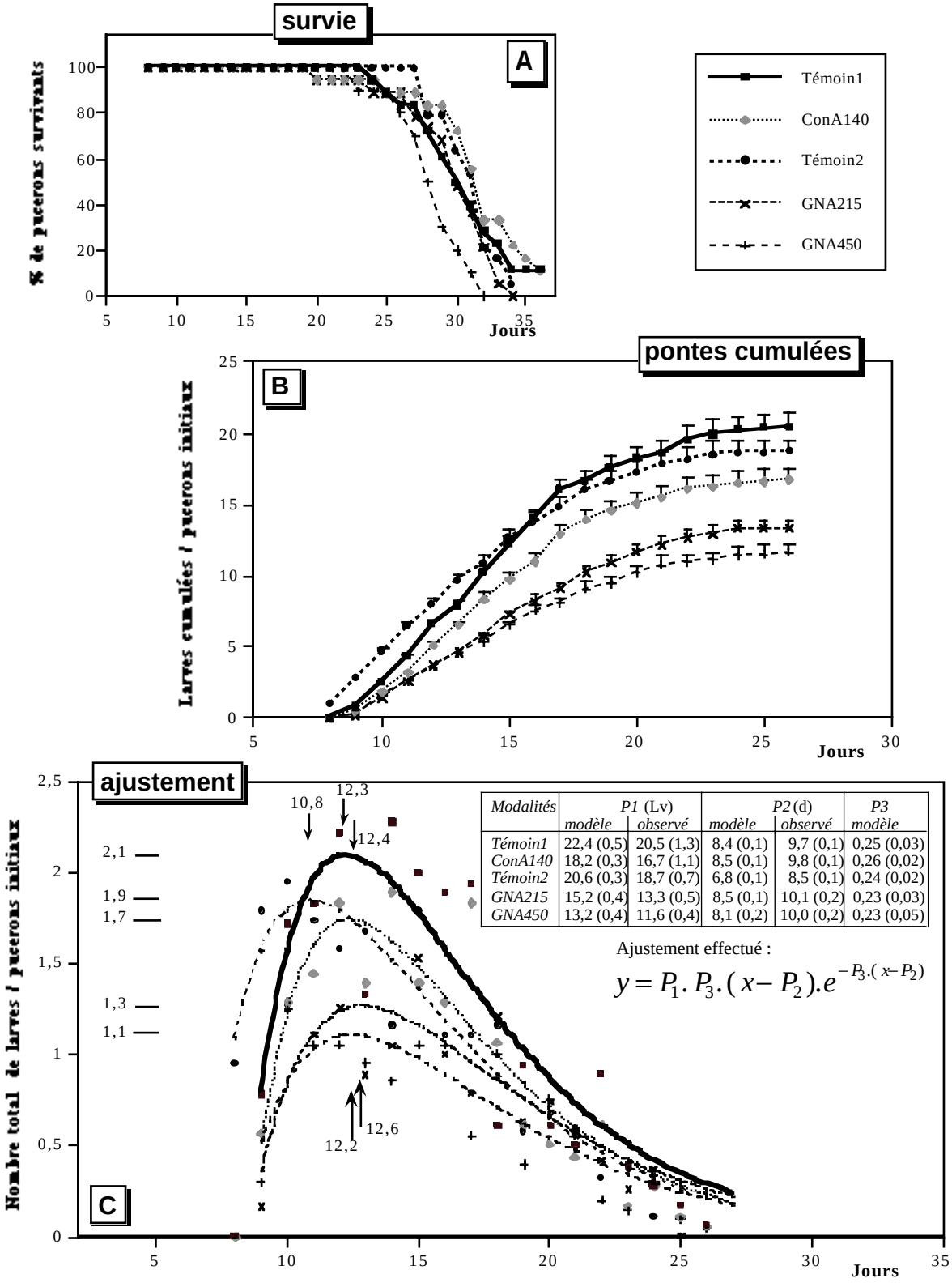
Dans le second test, les adultes sont pesés à J20 (jour que nous pensions correspondre à la moitié de la période reproductive). Le gain de masse des pucerons entre le jour J8 (qui correspond approximativement à la mue imaginale) et le jour J20 est significativement plus important pour les adultes placés sur milieux lectines (+ 62 % et + 56 % pour les deux concentrations de GNA, + 46 % pour les pucerons témoins). Ils rattrapent partiellement leur retard de croissance initial, sans le combler complètement cependant, puisqu'à J20 ils sont toujours significativement plus petits que les pucerons sur milieux témoins. La fécondité totale est moindre pour les adultes intoxiqués (- 29 % pour la GNA à 215 $\mu g.ml^{-1}$, -35 % pour la GNA à 450 $\mu g.ml^{-1}$, alors qu'en comparaison nous observons -19 % pour la ConA à 140 $\mu g.ml^{-1}$; variable Lv, tableau 9). Les effets sur la ponte sont ainsi parfaitement corrélés avec les inhibitions de croissance observées à la fin des stades larvaires.

L'impact global de l'intoxication par les lectines sur la **dynamique de reproduction** des pucerons est reflété par la réduction significative du taux intrinsèque d'accroissement naturel (r_m). Comme pour *A. pisum* le doublement de la dose de GNA, bien que diminuant significativement la croissance des adultes et le nombre de larves pondues, ne se traduit pas par une réduction significative de ce paramètre populationnel. La réduction du r_m se manifeste sur la figure 16C au niveau des ajustements décrivant la fécondité des adultes : les deux doses de GNA altèrent les dynamiques de pontes en décalant le pic de reproduction d'environ deux jours (10,8 *vs* 12,2 et 12,6). Il n'y a pas de différence sensible entre les deux modèles d'ajustements obtenus pour ces deux modalités.

Modalités			Témoin	ConA$_{140}$	Témoin	GNA$_{215}$	GNA$_{450}$
Concentration en lectines (µg.ml^{-1})			0	140	0	215	450
Effets sur les larves	♦ mortalité à J$_8$		9 %	21 %	5 %	12 %	4 %
	♦ nombre de pucerons inclus dans l'analyse ultérieure		18	18	19	19	20
	♦ masse moyenne à J$_8$ (µg)		222 (11) **a**	189 (9) **ab**	221 (10) **a**	153 (7) **bc**	140 (5) **c**
	♦ masse rapportée au témoin à J8		100	85	100	69	63
Effets sur les adultes	*Survie*	♦ **Dv** : durée de vie moyenne (j)	22,2 (0,7) **a**	23,5 (1,0) **a**	23,2 (0,5) **a**	21,8 (0,8) **a**	20,3 (0,6) **b**
		♦ mortalité des adultes à J$_{20}$	5 %	21 %	5 %	25 %	30 %
	Croissance	♦ **d** : durée de la période pré-reproductive	9,7 (0,1) **a**	9,8 (0,1) **b**	8,5 (0,1) **a'**	10,1 (0,2) **b'**	9,9 (0,2) **b'**
		♦ masse moyenne à J$_{20}$	-	-	315 (15) **a**	236 (10) **b**	218 (11) **b**
		♦ masse rapportée au témoin à J$_{20}$	-	-	100 %	75 %	69 %
		♦ gain de masse de J$_8$ à J$_{20}$	-	-	+ 46 % **a**	+ 61 % **b**	+ 56 % **b**
	Fécondité	♦ **Dr** : durée de la période reproductive	11,2 (0,5) **ab**	10,6 (0,4) **ab**	11,2 (0,3) **a**	10,1 (0,4) **b**	9,2 (0,3) **c**
		♦ **Lv** : nombre de larves pondues /puceron	20,5 (1,3) **a**	16,7 (1,1) **b**	18,7 (0,7) **a**	13,3 (0,5) **c**	11,6 (0,4) **d**
		♦ Lv/Dv	0,94 (0,07) **a**	0,72 (0,04) **b**	0,81 (0,03) **a**	0,62 (0,03) **c**	0,57 (0,02) **c**
		♦ Lv/Dr	1,81 (0,07) **a**	1,58 (0,06) **b**	1,67 (0,05)**ab**	1,33 (0,03) **c**	1,27 (0,03) **c**
		♦ **Md** : larves pondues en une durée égale à d	17,1 (1,0) **a**	13,8 (0,8) **b**	13,9 (0,6) **a'**	10,8 (0,5) **b'**	9,5 (0,5) **b'**
		♦ **DT** : durée pour doubler la taille de la population	3,12	3,38	2,91	3,81	3,94
	Taux intrinsèque d'accroissement naturel, r_m *(SD$_{jack}$) :*						
	selon :	♦ Birch (1948)	0,222 (0,005) **a**	0,205 (0,005) **b**	0,238 (0,006) **a'**	0,182 (0,004) **b'**	0,176 (0,003) **b'**
		♦ Wyatt & White (1977)	0,215 (0,006) **a**	0,197 (0,005) **b**	0,227 (0,005) **a'**	0,174 (0,004) **b'**	0,166 (0,003) **b'**

Tableau 9 - Effets de doses sublétales de ConA ou de GNA sur la croissance, la survie, et la fécondité du puceron du pêcher, *Myzus persicae*.

Les masses sont indiquées en µg, les durées en jours. L'erreur standard (SE) de chaque valeur est donnée entre parenthèses ; sur une même ligne les valeurs suivies par des lettres différentes diffèrent significativement au seuil de 5% (voir Matériels & Méthodes pour les tests appliqués). Lorsque les témoins ne diffèrent pas significativement, les valeurs moyennes des 5 modalités sont comparées, sinon chaque expérience est considérée indépendamment. Le jour J20 a été choisi comme devant correspondre à la moitié de la période reproductive.



Modalités	*P1* (Lv)		*P2* (d)		*P3*
	modèle	*observé*	*modèle*	*observé*	*modèle*
Témoin1	22,4 (0,5)	20,5 (1,3)	8,4 (0,1)	9,7 (0,1)	0,25 (0,03)
ConA140	18,2 (0,3)	16,7 (1,1)	8,5 (0,1)	9,8 (0,1)	0,26 (0,02)
Témoin2	20,6 (0,3)	18,7 (0,7)	6,8 (0,1)	8,5 (0,1)	0,24 (0,02)
GNA215	15,2 (0,4)	13,3 (0,5)	8,5 (0,1)	10,1 (0,2)	0,23 (0,03)
GNA450	13,2 (0,4)	11,6 (0,4)	8,1 (0,2)	10,0 (0,2)	0,23 (0,05)

Ajustement effectué :

$$y = P_1 . P_3 . (x - P_2) . e^{-P_3 . (x - P_2)}$$

Figure 16 - Effets de doses sublétales de la Concanavaline A et de la lectine du perce-neige (GNA) sur la survie et la fécondité du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae.*
(la légende est expliquée dans le texte ; l'erreur standard est reportée pour chaque point de la figure B ; les valeurs des paramètres P1, P2 et P3 (observés ou donnés par le modèle) sont présentées dans le tableau de la figure C - erreurs standards entre parenthèses).

3.2. Performances biologiques de *M. persicae* et d'*A. solani* sur des pommes de terre transgéniques exprimant les gènes de la GNA et/ou de la BCH

3.2.1. Estimation des taux d'expression des transgènes

3.2.1.1. Dosage de la GNA par chimioluminescence

Cette technique de dosage (ECL, fiche-protocole N°7) nous a permis de mettre en évidence la présence de la GNA dans les feuilles des lignées de pommes de terre de notre dernière série expérimentale (janvier 1995) : GNA2#23, GNA2#28, GNA2#30 et PWG6#85.

L'intensité de coloration des taches obtenues est cependant très variable en fonction des dépôts (5 à 6 par modalité). Ceci pourrait être lié à une **expression différentielle** du gène de la GNA dans les **feuilles** prélevées à **différents niveaux** de la plante, mais la **technique des dépôts** pourrait aussi expliquer cette variabilité (les extrémités coupées des feuilles sont appliquées, en les pinçant, sur la membrane de nitrocellulose). Comme nous nous y attendions, aucune tache n'apparaît sur les dépôts WAI9#12. Par contre, sur les dépôts témoins (feuilles de la variété Désirée), des taches sont clairement révélées (données non montrées). Un nouveau dosage réalisé par nos collègues britanniques montrent que cette coloration anormale est due à un artéfact de la technique[51]. De plus, ils ont confirmé les résultats obtenus avec les plantes transgéniques.

Si cette technique a l'avantage d'être relativement simple et rapide à mettre en oeuvre, elle ne permet cependant qu'un dosage qualitatif de la GNA. Elle s'avère donc utile pour effectuer un premier tri des transplants, mais seul un dosage quantitatif permet d'estimer si la transformation à des chances de s'avérer efficace pour induire une résistance aux pucerons.

3.2.1.2. Dosage de la GNA dans des extraits foliaires par immunomarquage sur membrane de nitrocellulose

Au cours de notre séjour à Durham en février 1994, nous avons dosé la GNA, par immunodétection, dans des extraits foliaires de pommes de terre transgéniques (lignées PWG6#85 et PBG6#47). Les feuilles n'ont pas été prélevées sur les plantes qui ont fait l'objet des tests biologiques avec *A. solani* pendant ce séjour, mais sur des plantes plus jeunes[52].

La figure 17 montre les résultats de ce dosage. Pour chaque lignée, la GNA a été dosée dans huit extraits indépendants (plantes différentes) et dans deux aliquotes par extrait. Le taux d'expression de la GNA est de l'ordre de 0,3 % pour l'une ou l'autre des lignées. Mais les résultats sont assez variables d'une feuille à l'autre, voire même entre les deux aliquotes de chaque extrait. Ce dernier point souligne "l'imprécision" de la mesure effectuée par cette technique. Il ressort que les taux d'expression que nous avons mesuré ici sont plus faibles que ceux mesurés antérieurement par Gatehouse et ses collaborateurs (1995a) sur des plantes des mêmes lignées (taux évalués à 1-2 %, lignées sur lesquels a été effectué le test biologique de juillet 1993 avec *M. persicae*). Au cours de notre séjour à Durham en janvier 1995, nous avons à nouveau appliqué cette technique de dosage pour évaluer les taux d'expression de la GNA dans les lignées qui ont alors fait l'objet de tests biologiques avec *A. solani* (résultats paragraphe 3.2.3). Nous ne sommes pas en mesure de présenter ces résultats ici, mais quoi qu'il en soit les taux mesurés semblent inférieurs à 1 %.

---

51 Temps d'exposition du film autoradiographique sur la membrane de nitrocellulose trop long.

52 Ces plantes ont également fait l'objet de tests biologiques avec *A. solani*, mais l'expérience a été rapidement stoppée en raison de mauvaises conditions expérimentales.

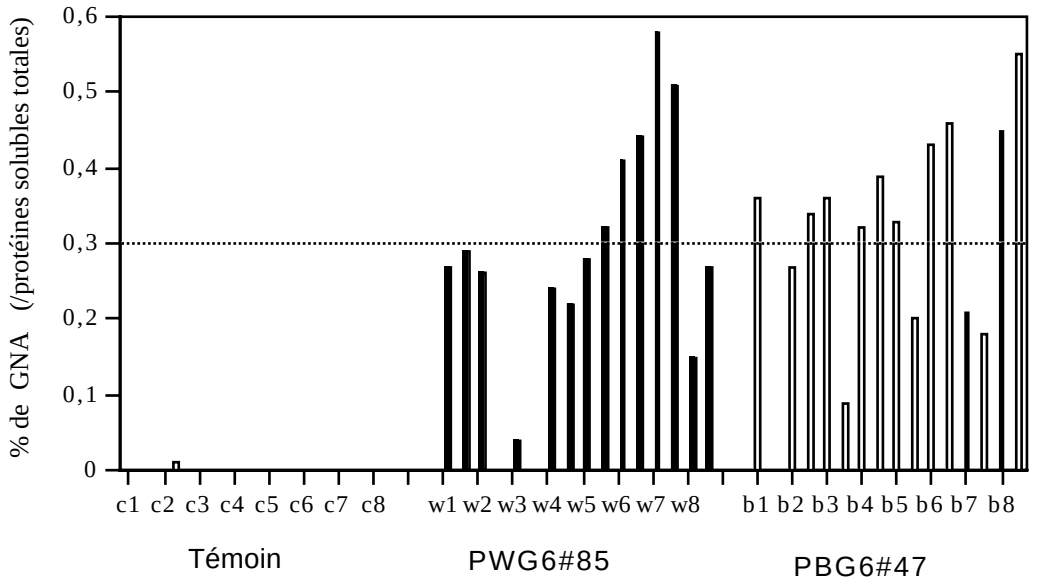


Figure 17 - Quantités de GNA dosées dans des extraits de tissus foliaires des lignées transgéniques PWG6#85 et PBG6#47 (plantes témoins = var. Désirée).

La GNA est dosée par immunomarquage sur membrane de nitrocellulose (Dot Blot). Les quantités sont exprimées en % de protéines par rapport aux protéines solubles totales dans les extraits. Pour chaque modalité, les dosages sont effectués sur deux aliquotes de huit extraits foliaires (n=2x8).

3.2.1.3. Estimation indirecte du taux d'expression des transgènes dans la sève phloémienne (plantes testées en janvier 1995)

La GNA est dosée par ELISA dans les tubes digestifs de pucerons intoxiqués pendant huit jours sur des milieux artificiels contenant différentes concentrations de cette lectine (0 à 500 µg.ml^{-1}). Sur la figure 18A nous avons reporté la densité optique des broyats de tubes digestifs[53] pour chaque dose d'intoxication (DO lue à 405 nm, huit minutes après l'ajout du substrat de révélation de la peroxidase). Le "bruit de fond" c'est-à-dire la DO lue pour les tubes digestifs de pucerons non intoxiqués n'est pas négligeable (DO = 0,100 ; soustrait sur la figure 18A). Il s'expliquerait notamment par une fixation partielle de l'anticorps primaire sur les parois des puits de la plaque de dépôts. Entre 5 et 100 µg.ml^{-1} la courbe présente une bonne linéarité (le coefficient de corrélation dose/DO, R^2 est égal à 0,90). Au delà de 100 µg.ml^{-1} la courbe atteint une phase plateau interprétable comme une saturation des tubes digestifs en GNA.

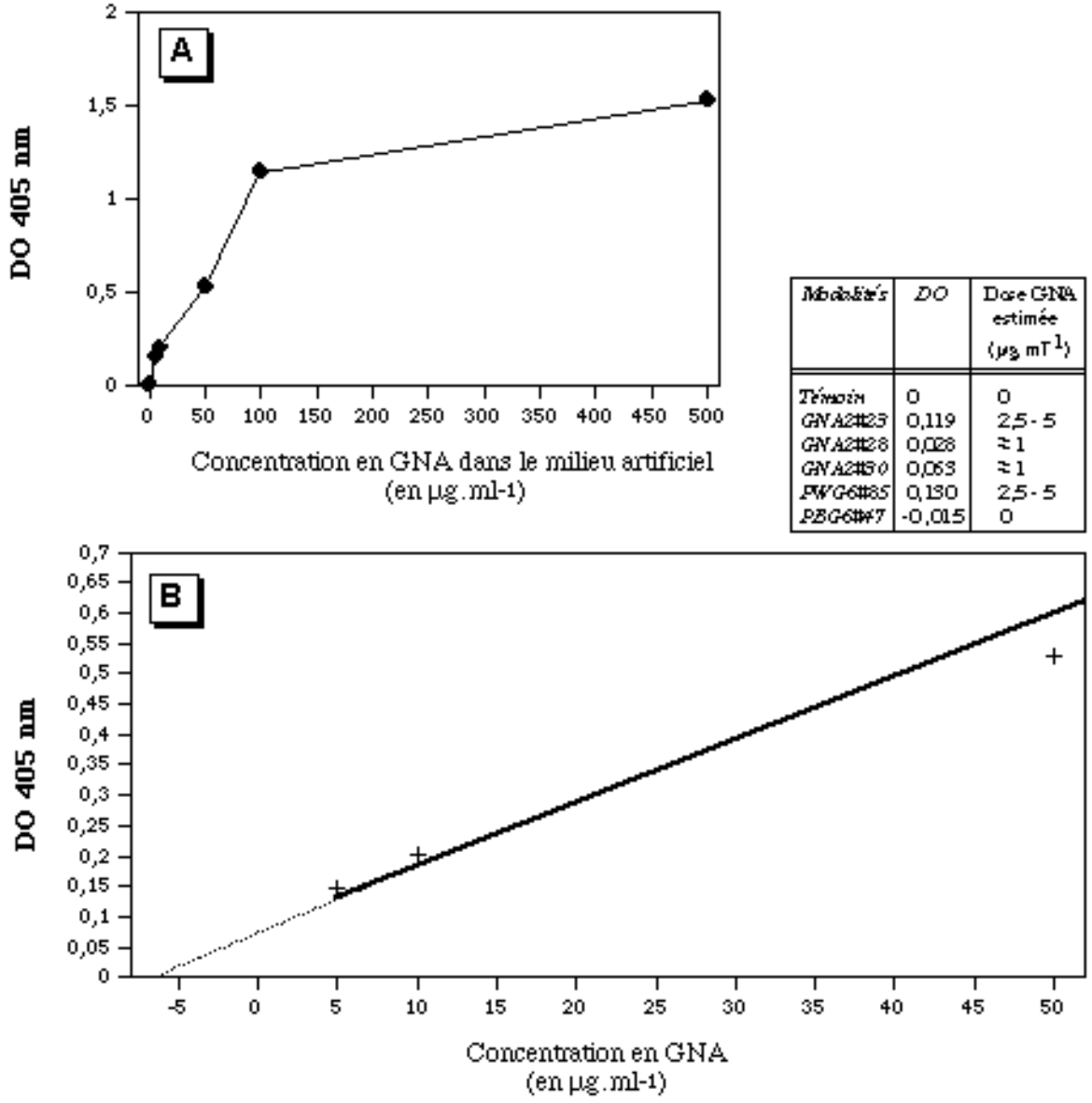
A partir de la courbe de la figure 18B et des DO mesurées pour les extraits de tubes digestifs des modalités "plantes transgéniques", nous pouvons déduire les concentrations en GNA dans la sève phloémienne de ces plantes. Ce raisonnement repose sur deux conditions :

-1) le “taux de rétention” de la GNA par des pucerons sur milieu artificiel est analogue à celui des pucerons sur plantes ;

-2) les concentrations en GNA dans la sève doivent être comprises entre 5 et 100 µg.ml^{-1}. La sensibilité du dosage ne permet pas de quantifier avec précision la GNA en deçà de cette gamme lorsque nous travaillons avec des dépôts équivalents à deux tubes digestifs. Or, précisément, les concentrations estimées sont, au mieux, de 5 µg.ml^{-1} dans la sève des lignées GNA2#23 et PWG6#85 (tableau de la figure 18B). Les valeurs pour GNA2#28 et GNA2#30

53 Chaque extrait correspond au broyat de deux tubes digestifs.

sont données à titre indicatif. Pour chaque modalité un seul extrait est dosé, ce qui rajoute une incertitude à la mesure obtenue[54].



Modalités	DO	Dose GNA estimée (µg.ml-1)
Témoin	0	0
GNA2#23	0,119	2,5 - 5
GNA2#28	0,028	≈ 1
GNA2#30	0,063	≈ 1
PWG6#85	0,130	2,5 - 5
PBG6#47	-0,015	0

Figure 18 - Quantités de GNA dosées par ELISA dans les tubes digestifs de pucerons de l'espèce *Aulacorthum solani* intoxiqués 8 jours par la lectine sur milieux artificiels.

La figure B reprend les données de la figure A mais se rapporte uniquement aux extraits de tubes digestifs des pucerons intoxiqués aux concentrations comprises entre 5 et 50 µg.ml-1. Le tableau en médaillon donne les concentrations en GNA dans la sève phloémienne des différentes lignées transgéniques estimées indirectement de ce dosage (voir texte pour plus de détails).

54 Les DO des extraits (équivalents à deux tubes digestifs) dilués au 1/2, 1/5 et 1/10 ont également été mesurées, mais ne sont pas exploitables.

En résumé, il ressort logiquement que la GNA n'est pas détectée dans les tubes digestifs des pucerons prélevés sur les plantes témoins (var. Désirée ou lignée WAI9#12). L'information de cette série de dosage est cependant que de la GNA est clairement détectée dans des tubes digestifs de *M. persicae* s'alimentant sur les lignées transgéniques, témoignant de la **présence** de la **lectine** dans la **sève phloémienne** de ces plantes. Cela était évidemment espéré, mais nullement acquis *a priori*, car les constructions utilisées pour la transformation, et notamment le promoteur (CaMV 35S), ne sont pas optimisés pour une expression phloème-spécifique.

La concentration en GNA dans la sève phloémienne des plantes transgéniques, compte tenu de toutes nos hypothèses, serait cependant au maximum de l'ordre de 5 $\mu g.ml^{-1}$, et semblerait variable selon les lignées. Par manque de temps, nous n'avons pas pu recommencer ce dosage sur des broyats de vingt tubes digestifs par exemple, ce qui nous aurait permis de doser la GNA avec une plus grande précision puisque nous serions alors dans la gamme de sensibilité de la méthode ELISA utilisée.

3.2.2. Performances biologiques de **M. persicae** *sur des pommes de terre transgéniques exprimant la GNA seule ou en combinaison avec la BCH (juillet 1993)*

Des tests à long terme, similaires dans le principe à ceux décrits précédemment sur milieux artificiels, ont été menés avec *M. persicae* sur les deux lignées PWG6#85 et PBG6#47. La première exprime la GNA seule alors que la seconde exprime également la BCH. Les paramètres décrivant la dynamique de fécondité des pucerons sur des plantes de ces lignées sont comparés à ceux de pucerons placés sur la variété Désirée.

A J6, pour chaque lignée transgénique, trente jeunes adultes sont placés individuellement dans des cages (3x10 plantes). De même, quarante pucerons sont isolés sur dix plantes témoins différentes. La variable N du tableau 10 indique le nombre de pucerons inclus dans l'analyse : les individus supprimés (4, 5 et 8 respectivement pour les plantes témoins, PBG6#47 et PWG6#85) sont morts prématurément[55]. Nous attribuons cette mortalité aux conditions expérimentales (insecte blessé, feuille abîmée) et non aux effets induits par les plantes : à J6, la survie n'est pas significativement différente entre les pucerons sur plantes transgéniques et ceux sur plantes témoins ($p>5\%$).

Néanmoins le tableau 10 et la figure 19A indiquent que les pucerons meurent plus rapidement sur les plantes transgéniques. Mais ces **lignées transformées** ont surtout des **effets marqués** et significatifs au niveau de la **fécondité**. L'optimum du nombre de larves pondues par femelle et par jour est 4,1 et 4,2 pour PBG6#47 et PWG6#85 respectivement, alors que celui de l'ajustement obtenu pour les pucerons sur plantes témoins s'élève à 5,4 (figure 19C).

Les taux intrinsèques d'accroissement naturel (r_m) sont également significativement plus faibles pour les pucerons sur plantes transformées en comparaison de ceux des plantes témoins (procédure de Conover, $p<5\ \%$). Cependant ces taux ne sont pas différents entre PBG6#47 et PWG6#85 ($p=90\ \%$). La différence entre les plantes témoins et les plantes transgéniques s'explique principalement par le décalage des premiers jours de ponte[56]. Cette observation s'applique principalement aux adultes de la lignée PWG6#85 qui arrivent en réalité à compenser partiellement leur retard de maturité (1,8 jours de décalage avec les

---

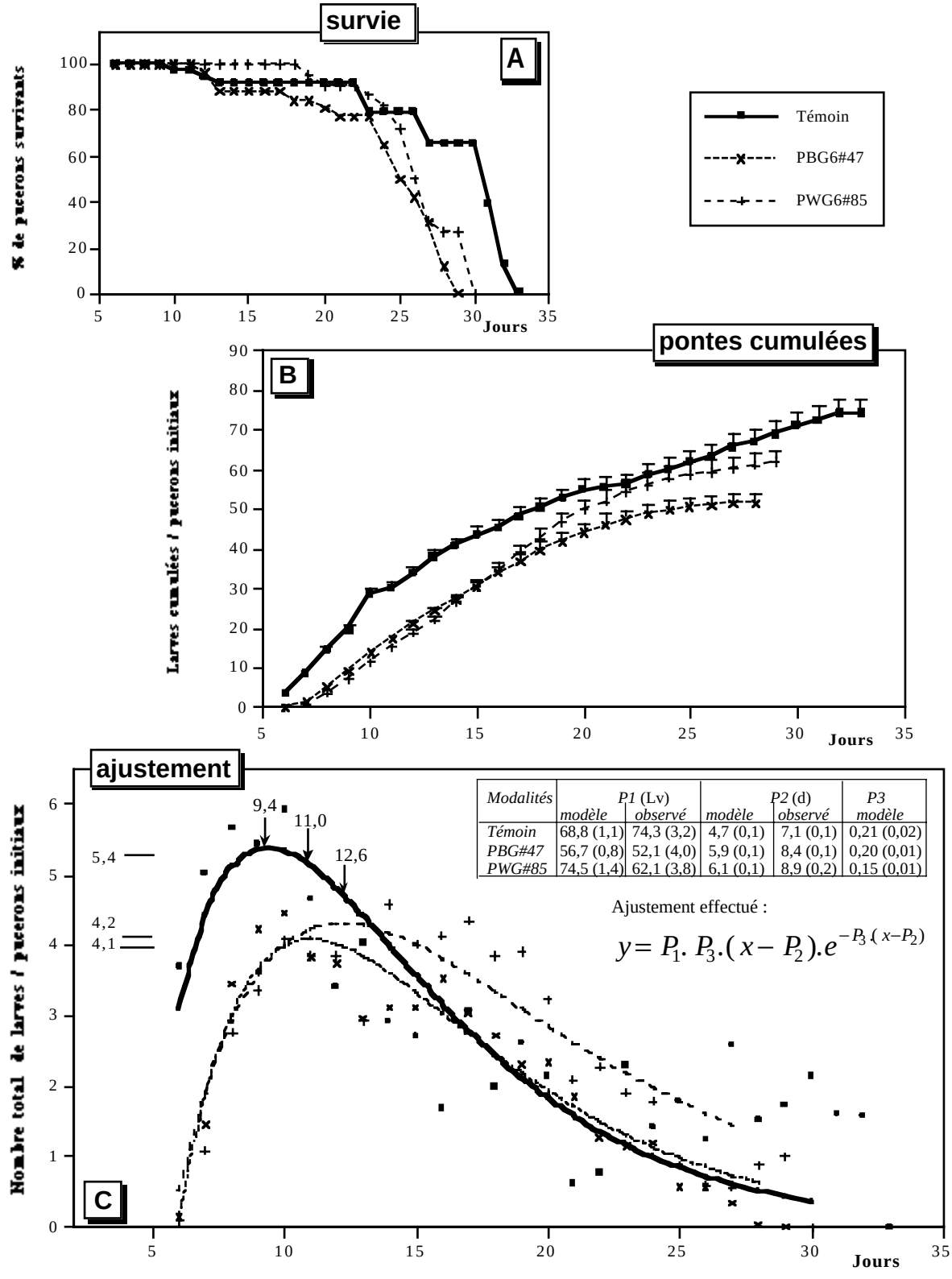
55 Ils sont morts avant le jour J12. La durée de J6 à J12 correspond à la durée prise en compte pour le calcul de la variable Md. L'estimation des r_m individuels (et *a fortiori* des autres variables) pour ces pucerons n'est pas justifiée.

56 Nous avons déjà souligné précédemment la prépondérance des premiers jours de ponte dans le calcul des r_m.

Modalités			Témoin		PBG6#47		PWG6#85	
Protéines exprimées					GNA+ chitinase		GNA	
Effets sur les adultes	♦ **N** : nombre de pucerons inclus dans l'analyse ultérieure		36		25		22	
	Survie	♦ **Dv** : durée de vie moyenne	24,6 (1,0)	**a**	18,2 (1,0)	**b**	20,4 (0,7)	**b**
		♦ mortalité à J_{26}	76 %		42 %		50 %	
	Croissance	♦ **d** : durée de la période pré-reproductive	7,1 (0,1)	**a**	8,4 (0,1)	**b**	8,9 (0,2)	**c**
	Fécondité	♦ **Dr** : durée de la période reproductive	23,9 (1,1)	**a**	15,7 (1,0)	**b**	17,0 (0,7)	**ab**
		♦ **Lv** : nombre de larves pondues /puceron	74,3 (3,2)	**a**	52,0 (4,0)	**b**	62,1 (3,8)	**b**
		♦ Lv/Dv	3,08 (0,09)		2,84 (0,18)		3,03 (0,16)	
		♦ Lv/Dr	3,18 (0,09)	**a**	3,31 (0,18)	**ab**	3,61 (0,13)	**b**
		♦ **Md :** nombre de larves pondues en une durée égale à d	38,4 (1,5)	**a**	32,2 (2,3)	**b**	37,2 (1,6)	**a**
		♦ **DT** : durée pour doubler la taille de la population	1,81		2,24		2,30	
	Taux intrinsèque d'accroissement naturel, $\boldsymbol{r_m}$ *(*SD_{jack}*) :*							
		♦ Birch (1948)	0,382 (0,005)	**a**	0,309 (0,008)	**b**	0,301 (0,008)	**b**
		♦ Wyatt & White (1977)	0,379 (0,005)	**a**	0,303 (0,010)	**b**	0,304 (0,008)	**b**

Tableau 10 - Performances biologiques du puceron du pêcher, *Myzus persicae,* sur pommes de terre transgéniques.

Les durées sont indiquées en jours. L'erreur standard (SE) de chaque valeur est donnée entre parenthèses ; sur une même ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes diffèrent significativement au seuil de 5% (voir Matériels & Méthodes pour les tests appliqués). Le jour J_{26} correspond au premier jour où une différence significative apparaît entre les 3 modalités au niveau de la mortalité.



Modalités	*P1* (Lv)		*P2* (d)		*P3*
	modèle	*observé*	*modèle*	*observé*	*modèle*
Témoin	68,8 (1,1)	74,3 (3,2)	4,7 (0,1)	7,1 (0,1)	0,21 (0,02)
PBG#47	56,7 (0,8)	52,1 (4,0)	5,9 (0,1)	8,4 (0,1)	0,20 (0,01)
PWG#85	74,5 (1,4)	62,1 (3,8)	6,1 (0,1)	8,9 (0,2)	0,15 (0,01)

Ajustement effectué :

$$y = P_1 . P_3 . (x - P_2) . e^{-P_3 (x - P_2)}$$

Figure 19 - Performances biologiques du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, sur deux lignées de pommes de terre transgéniques, PBG6#47 et PWG6#85.

(la légende est expliquée dans le texte ; l'erreur standard est reportée pour chaque point de la figure B ; les valeurs des paramètres P1, P2 et P3 (observés ou donnés par le modèle) sont présentées dans le tableau de la figure C - erreurs standards entre parenthèses).

témoins ; variable d) en pondant en moyenne par jour pendant leur période reproductive plus de larves que les témoins (variable Lv/Dr). Mais à long terme les pucerons PWG6#85 sont moins performants car ils meurent plus rapidement que les témoins (leur période reproductive est donc plus courte).

Les pucerons sur plantes PBG6#47 semblent plus affectés encore en terme de fécondité ; ils pondent en moyenne moins de larves que les pucerons PWG6#85 (variable Lv, -22 larves (-30 %) par rapport à la modalité témoin).

Les lots de pucerons sur les deux lignées transgéniques présentent donc des dynamiques de ponte légèrement différentes. Cette remarque est visualisée par les valeurs moyennes de la variable Md et les ajustements de la figure 19C.

La diminution de la production larvaire sur les lignées transgéniques s'accompagne aussi d'un décalage du pic de fécondité. Pour la lignée PBG6#47 ce décalage est de 1,6 jours alors qu'il est le double pour la lignée PWG6#85. Ces décalages calculés par les ajustements des données sont en adéquation avec les observations (variable d : 1,3 et 1,8 jours de décalage pour PBG6#47 et PWG6#85 respectivement).

3.2.3. Performances biologiques d'A. solani sur des pommes de terre transgéniques exprimant la GNA seule ou en combinaison avec le BCH (février 1994 - janvier 1995)

Nous avons également observé les performances biologiques du puceron commun des serres, *A. solani* sur six lignées transgéniques. Les lignées PWG6#85 et PBG6#47 ont fait l'objet d'un premier test (février 1994). Un second test (janvier 1995) a été effectué sur PWG6#85 et quatre autres lignées transformées : trois exprimant la GNA seule (GNA2#23, GNA2#28, GNA2#30), la quatrième (WA19#12) transformée avec le gène de WAI, mais ne l'exprimant pas. Cette dernière constitue ainsi un témoin transformé, par opposition à la modalité témoin qui correspond à des plantes non transformées (var. Désirée). Par souci de clarté, les courbes de survie et de fécondité des modalités du second test sont représentées sur deux figures distinctes (figures 21 & 22). Les courbes des modalités témoin et GNA2#23 apparaissent dans les deux figures pour faciliter l'analyse globale des résultats.

Les valeurs moyennes du tableau 11 et les courbes de la figure 20 se rapportant au premier test, nécessitent peu de commentaires : la fécondité d'*A. solani* est réduite de manière drastique sur la lignée PWG6#85 et surtout sur la lignée PBG6#47. Ces résultats particulièrement intéressants ne sont pas liés à une mortalité plus grande des pucerons sur les plantes transgéniques. Les taux de survie des pucerons sur chacune des modalités ne diffèrent jamais significativement au cours des 30 jours du test (figure 20A).

Modalité			Témoin	PBG6#47	PWG6#85
Protéines				GNA+ chitinase	GNA
Effets sur les adultes	♦ **N** : nombr		13	18	15
	Survie	♦ **Dv** : durée de vie moyenne	27,4 (0,8)	26,1 (1,4)	26,3 (1,1)
		♦ mortalité à J_{26}	39 %	29 %	33 %
	Croissance	♦ **d** : durée de la période pré-reproductive (calculée uniquement avec les pucerons qui ont pondu)	9,2 (0,3) **a**	-	10,6 (0,4) **b**
	Fécondité	♦ **Dr** : durée de la période reproductive	9,9 (0,9) **a**	0,7 (0,3)	4,3 (0,6) **b**
		♦ **Lv** : nombre de larves pondues /puceron	25,5 (3,2) **a**	1,6 (0,7)	9,6 (2,0) **b**
		♦ Lv/Dv	1,34 (0,20) **a**	0,08 (0,04)	0,60 (0,14) **b**
		♦ Lv/Dr	2,51 (0,23) **a**	0,60 (0,25)	1,85 (0,28) **b**
		♦ **DT** : durée pour doubler la taille de la population	2,97	16,91	4,12
	Taux intrinsè				
		♦ Birch (1948)	0,243	0,040	0,173

Tableau 11 - Performances biologiques d'*Aulacorthum solani*, sur pommes de terre transgéniques (février 1994).

Les durées sont indiquées en jours. L'erreur standard (SE) de chaque valeur est donnée entre parenthèses ; sur une même ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes, diffèrent significativement au seuil de 5% (les faibles valeurs obtenues avec PBG6#47 n'ont pas nécessité que nous les prenions en compte dans l'analyse statistique - voir Matériels & Méthodes pour les tests appliqués). Le jour J_{26} correspond à la durée de vie moyenne calculée la plus courte.

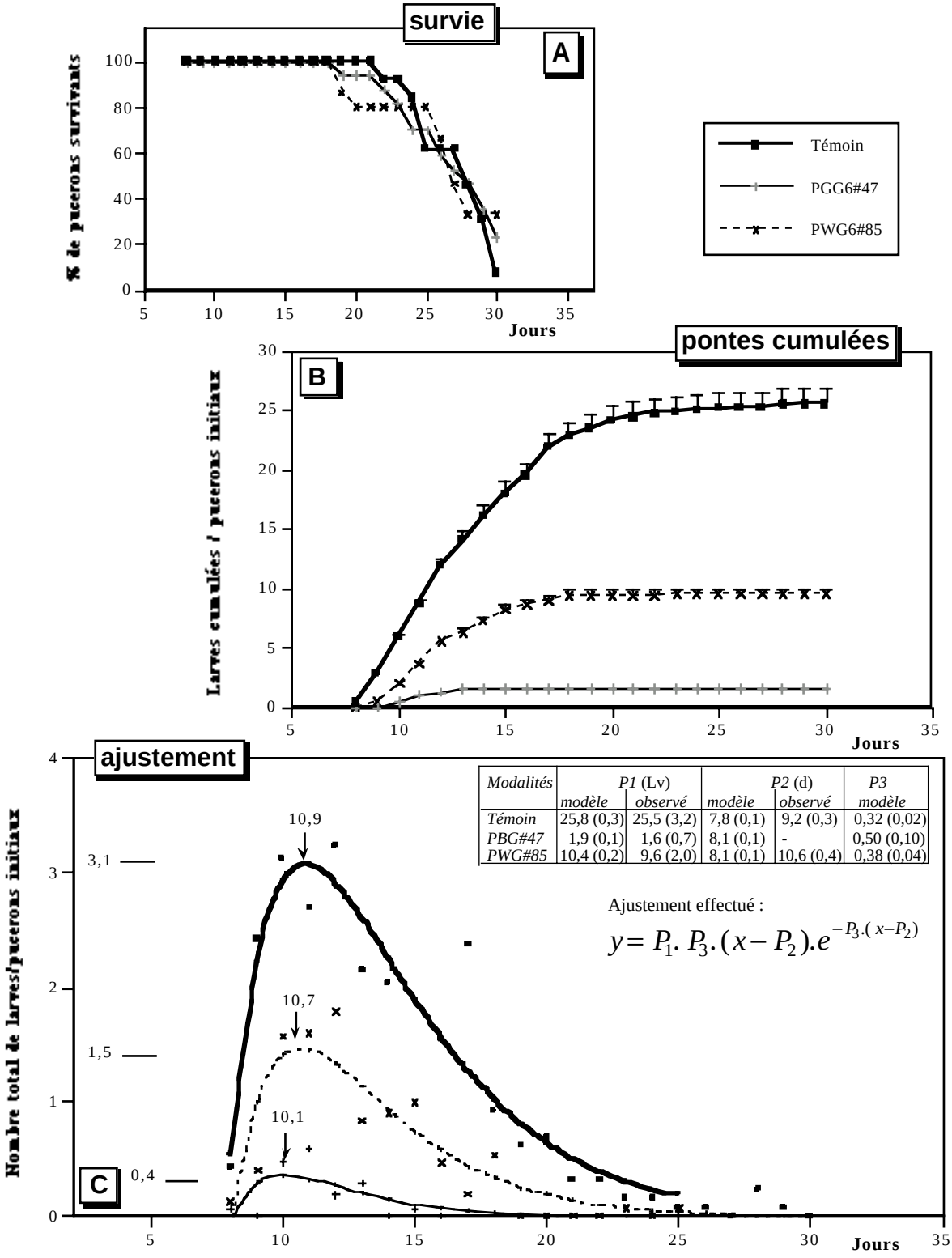

survie
A
% de pucerons survivants
Jours
Témoin
PGG6#47
PWG6#85
pontes cumulées
B
Larves cumulées / pucerons initiaux
Jours
ajustement
C
Nombre total de larves/pucerons initiaux
10,9
10,7
10,1
3,1
1,5
0,4
Jours
Modalités | P1 (Lv) modèle | P1 (Lv) observé | P2 (d) modèle | P2 (d) observé | P3 modèle
Témoin | 25,8 (0,3) | 25,5 (3,2) | 7,8 (0,1) | 9,2 (0,3) | 0,32 (0,02)
PBG#47 | 1,9 (0,1) | 1,6 (0,7) | 8,1 (0,1) | - | 0,50 (0,10)
PWG#85 | 10,4 (0,2) | 9,6 (2,0) | 8,1 (0,1) | 10,6 (0,4) | 0,38 (0,04)
Ajustement effectué :
$y = P_1 . P_3 . (x - P_2) . e^{-P_3 . (x - P_2)}$

Figure 20 - Performances biologiques du puceron commun des serres, *Aulacorthum solani*, sur deux lignées de pommes de terre transgéniques, PBG6#47 et PWG6#85.
(la légende est expliquée dans le texte ; l'erreur standard est reportée pour chaque point de la figure B ; les valeurs des paramètres P1, P2 et P3 (observés ou donnés par le modèle) sont présentées dans le tableau de la figure C - erreurs standards entre parenthèses).

La seconde série inclut la lignée PWG6#85 pour confirmation des performances observées par cette lignée d'une part avec *M. persicae*, et surtout avec *A. solani.* Les autres lignées n'avaient jamais été testées auparavant et nous ne disposions pas de PBG6#47 pour cette deuxième série.

Malheureusement, le tableau 12 et les courbes de la figure 22 montrent que toutes les performances biologiques des pucerons sur la lignée PWG6#85 sont dans ce cas identiques à ceux placés sur les plantes témoins (transformées, lignée WAI9#12, ou non, variété Désirée). Pour les autres plantes, aucun lot de pucerons de l'une ou l'autres des lignées transgéniques testées n'est sensiblement affecté, ni en terme de survie (figures 21A et 22A), ni globalement en terme de fécondité (tableau 12).

La lignée GNA2#23 semble même induire des effets positifs. Pour certaines variables, des différences significatives ($p< 5$ %) apparaissent entre les lignées GNA2#28 ou GNA2#30 et les plantes témoins. Cette remarque s'applique en particulier au taux intrinsèque d'accroissement naturel et les résultats des estimations par les deux méthodes sont peu tranchés mais conduisent à différencier ces deux lignées. Mais nous remarquons néanmoins que le nombre total de larves pondues (variable Lv) ne diffère pas significativement entre les pucerons placés sur plantes témoins et ceux déposés sur les plantes des lignées GNA2#28 et GNA2#30. Les différences entre les r_m s'expliquent donc uniquement par le jour de décalage existant entre les premières pontes (1,0 et 1,3 jour pour GNA2#28 et GNA2#30 respectivement, variable d, tableau 12). Ce retard de maturité se traduit par un décalage de 1,5 à 2 jours des pics de fécondité obtenus après ajustement des données (figure 21C). *A contrario,* nous n'observons pas un tel décalage pour la lignée GNA2#23. Les pucerons sur cette lignée s'avèrent encore bien plus performants que les pucerons témoins, et nous aurons soin d'en reparler en discussion finale.

Modalités			Témoin	GNA2#23	GNA2#28	GNA2#30	PWG6#85	WAI9#12
Protéines exprimées			-	GNA	GNA	GNA	GNA-chitinase	(WAI non exprimée)
Effets sur les larves	♦ **N**=nombre de larves dans la population à J_0		57	33	45	35	38	44
	♦ masse moyenne à J_8 (µg)		556 (24) **a**	545 (29) **ab**	536 (27) **ab**	430 (27) **b**	532 (25) **ab**	565 (18) **a**
	♦ masse rapportée au témoin		100	98	96	77	96	102
	♦ **n** = nombre de pucerons inclus dans l'analyse ultérieure		17	15	20	22	23	21
	♦ masse moyenne à J_8 des pucerons retenus		699 (49) **a**	537 (36) **ab**	570 (47) **ab**	465 (32) **b**	563 (32) **ab**	625 (29) **ab**
	♦ masse rapportée au témoin		100	77	82	67	81	89
Effets sur les adultes	*Survie*	♦ **Dv** : durée de vie moyenne	31,5 (0,4)	31,1 (0,5)	31,5 (0,4)	31,5 (0,3)	31,8 (0,1)	31,4 (0,5)
	Croissance	♦ **d** : durée de la période pré-reproductive	13,1 (0,2) **a**	12,9 (0,3) **a**	14,1 (0,2) **b**	14,4 (0,2) **b**	13,4 (0,2) **a**	13,2 (0,3) **a**
	Fécondité	♦ **Dr** : durée de la période reproductive	17,4 (0,5) **ab**	18,1 (0,6) **a**	16,7 (0,5) **bc**	16,2 (0,4) **c**	18,0 (0,3) **a**	17,9 (0,6) **a**
		♦ **Lv** : nombre de larves pondues /puceron	49,2 (2,2) **a**	58,3 (2,8) **b**	49,4 (1,7) **a**	47,7 (1,5) **a**	50,7 (1,9) **a**	51,6 (2,3) **ab**
		♦ Lv/Dv	2,20 (0,09) **a**	2,64 (0,12) **b**	2,21 (0,09) **a**	2,12 (0,06) **a**	2,22 (0,08) **a**	2,30 (0,09) **a**
		♦ Lv/Dr	2,83 (0,10)	3,23 (0,13)	2,98 (0,09)	2,96 (0,11)	3,00 (0,13)	2,91 (0,15)
		♦ **Md** : nombre de larves pondues en une durée égale à d	38,2 (1,3) **a**	45,5 (1,6) **b**	40,8 (1,5) **ab**	42,5 (1,1) **b**	39,1 (1,0) **a**	39,3 (1,5) **a**
		♦ **DT** : durée pour doubler la taille de la population	3,24	3,16	3,45	3,57	3,30	3,25
	Taux intrinsèque d'accroissement naturel, r_m (SD_{jack}) :							
		♦ Birch (1948)	0,214 (0,004) **a**	0,219 (0,005) **a**	0,201 (0,004) **b**	0,194 (0,004) **b**	0,210 (0,003) **a**	0,213 (0,005) **a**
		♦ Wyatt & White (1977)	0,206 (0,004) **ab**	0,221 (0,007) **a**	0,195 (0,004) **cd**	0,193 (0,004) **d**	0,203 (0,003) **bc**	0,206 (0,004) **ab**

Tableau 12 - Performances biologiques d'*Aulacorthum solani* sur pommes de terre transgéniques (janvier 1995).

Les masses sont indiquées en µg, les durées en jours. L'erreur standard (SE) de chaque valeur est donnée entre parenthèses ; sur une même ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes diffèrent significativement au seuil de 5% (voir Matériels & Méthodes pour les tests appliqués).

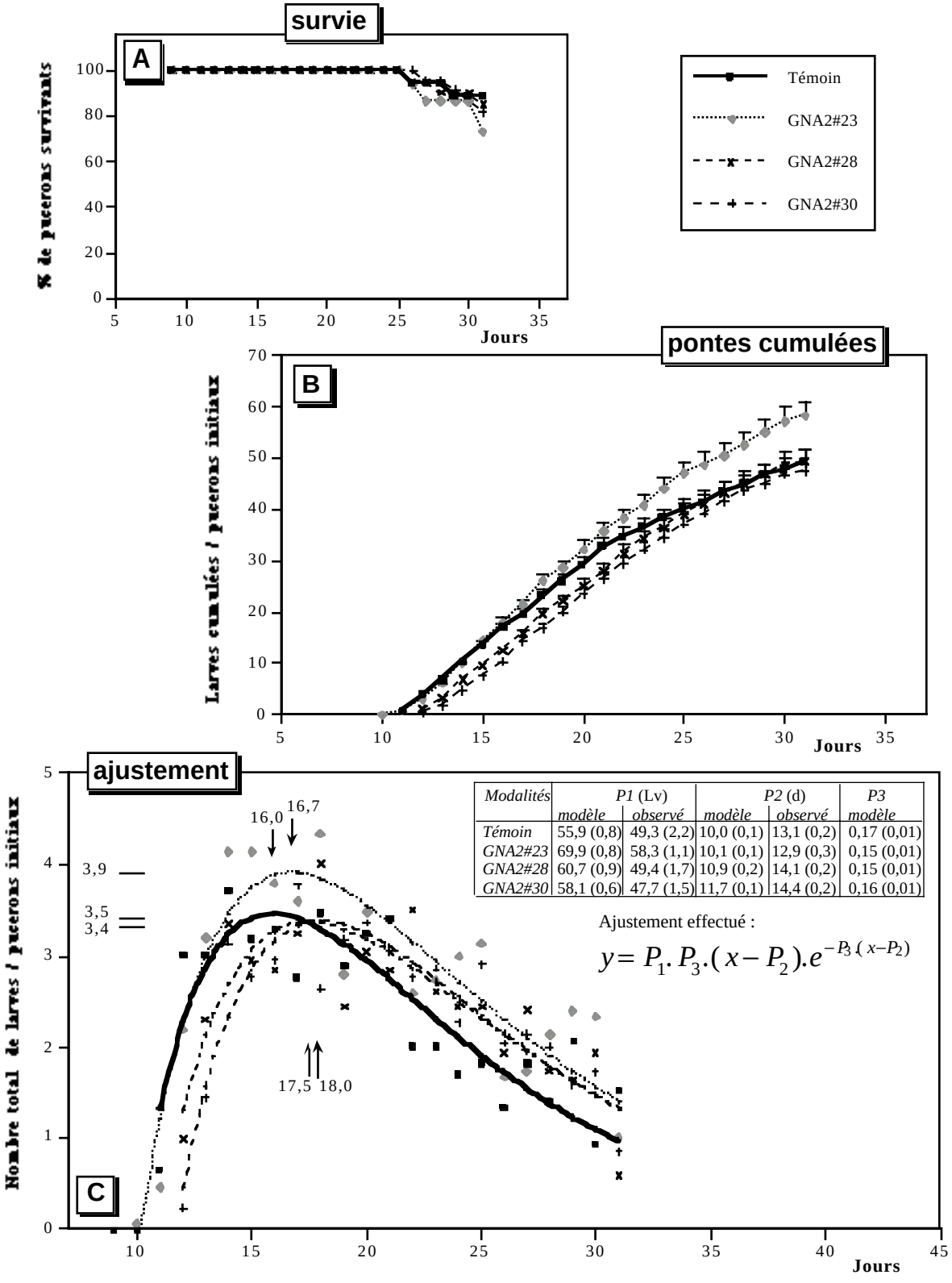
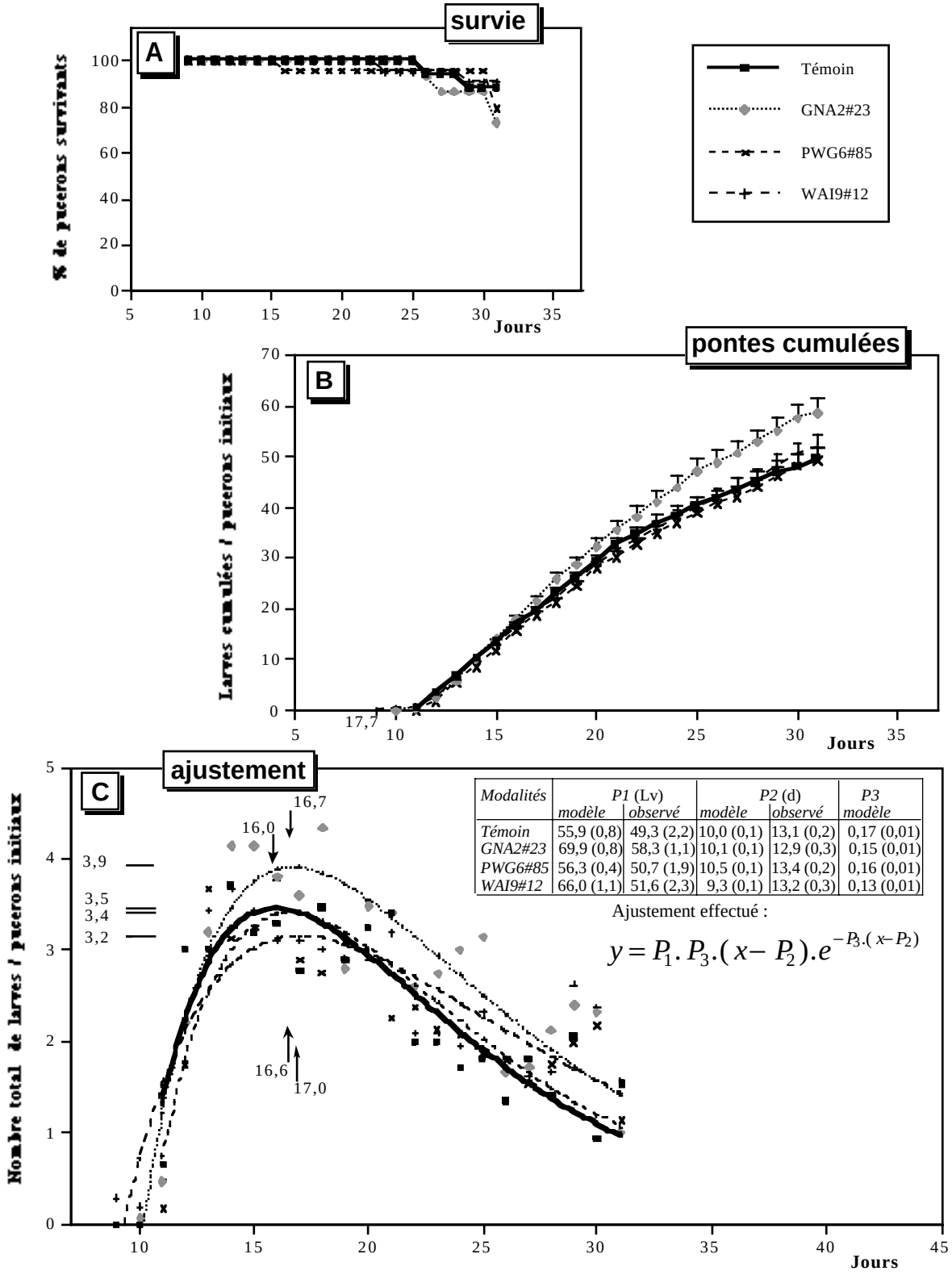

survie
A
% de pucerons survivants
Jours
Témoin
GNA2#23
GNA2#28
GNA2#30
pontes cumulées
B
Larves cumulées / pucerons initiaux
Jours
ajustement
C
Nombre total de larves / pucerons initiaux
16,0
16,7
3,9
3,5
3,4
17,5
18,0
Jours
Modalités | P1 (Lv) modèle | P1 (Lv) observé | P2 (d) modèle | P2 (d) observé | P3 modèle
Témoin | 55,9 (0,8) | 49,3 (2,2) | 10,0 (0,1) | 13,1 (0,2) | 0,17 (0,01)
GNA2#23 | 69,9 (0,8) | 58,3 (1,1) | 10,1 (0,1) | 12,9 (0,3) | 0,15 (0,01)
GNA2#28 | 60,7 (0,9) | 49,4 (1,7) | 10,9 (0,2) | 14,1 (0,2) | 0,15 (0,01)
GNA2#30 | 58,1 (0,6) | 47,7 (1,5) | 11,7 (0,1) | 14,4 (0,2) | 0,16 (0,01)
Ajustement effectué :
$y = P_1 . P_3 . (x - P_2) . e^{-P_3 (x - P_2)}$

Figure 21 - Performances biologiques du puceron commun des serres, *Aulacorthum solani,* sur trois lignées de pommes de terre transgéniques, GNA2#23, GNA2#28 et GNA2#30.
La légende est expliquée dans le texte ; l'erreur standard est reportée pour chaque point de la figure B ; les valeurs des paramètres P1, P2 et P3 (observés ou donnés par le modèle) sont présentées dans le tableau de la figure C - erreurs standards entre parenthèses.



Modalités	*P1* (Lv)		*P2* (d)		*P3*
	modèle	*observé*	*modèle*	*observé*	*modèle*
Témoin	55,9 (0,8)	49,3 (2,2)	10,0 (0,1)	13,1 (0,2)	0,17 (0,01)
GNA2#23	69,9 (0,8)	58,3 (1,1)	10,1 (0,1)	12,9 (0,3)	0,15 (0,01)
PWG6#85	56,3 (0,4)	50,7 (1,9)	10,5 (0,1)	13,4 (0,2)	0,16 (0,01)
WAI9#12	66,0 (1,1)	51,6 (2,3)	9,3 (0,1)	13,2 (0,3)	0,13 (0,01)

Figure 22 - Performances biologiques du puceron commun des serres, *Aulacorthum solani*, sur trois lignées de pommes de terre transgéniques, GNA2#23, PWG6#85 et WAI9#12 (complément figure 21).

La légende est expliquée dans le texte ; l'erreur standard est reportée pour chaque point de la figure B ; les valeurs des paramètres P1, P2 et P3 (observés ou donnés par le modèle) sont présentées dans le tableau de la figure C - erreurs standards entre parenthèses.

4. Discussion

L'analyse globale réalisée à partir des données des tests préliminaires effectués sur 27 lectines de classes différentes (Rahbé *et al.*, 1995) permet de mieux comprendre notre intérêt pour les lectines à mannose/glucose. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un criblage systématique de lectines pour évaluer leur toxicité vis à vis d'un puceron est réalisé. Plusieurs faits intéressants ressortent de l'analyse en composantes principales :

- des **lectines à mannose/glucose** se révèlent parmi **les plus toxiques** des lectines testées. Elles induisent des mortalités et des inhibitions de croissance significatives à la plus forte concentration testée (250 $\mu g.ml^{-1}$). Il s'agit de la ConA, de la GNA, de la PSA et de la LcH.

- cependant, toutes les **lectines à mannose/glucose ne montrent pas les mêmes effets** toxiques, tant au niveau de la mortalité (VVAm, la CPA et la VFA sont inactives) qu'au niveau de la croissance (VVAm, CPA et VFA inhibent très peu la croissance à 250 $\mu g.ml^{-1}$, contrairement à ConA, GNA, PSA et LcH). Le graphe en étoiles de la figure 9C2 illustre parfaitement cette observation.

- mise à part la lectine de l'amaranthe, dont la toxicité a été confirmée par une expérience complémentaire (Rahbé, communication personnelle), les **lectines des autres classes** ne présentent pas de propriétés aphidotoxiques intéressantes à exploiter dans le cadre de notre étude. L'ECA et la BSII peuvent cependant être distinguées car elles induisent des inhibitions de croissance de l'ordre de 40 à 50 % à 250 $\mu g.ml^{-1}$.

L'objectif principal de ce premier criblage était de mettre en évidence une éventuelle **corrélation entre la spécificité osidique** des lectines et leur **activité insecticide**. Les faits précédents démontrent clairement qu'aucune règle générale ne vient corroborer cette hypothèse. Si cette remarque s'applique aux lectines à mannose/glucose, elle est vrai aussi pour les lectines des autres classes, même si les effets différentiels de ces dernières sont moins contrastés. Par exemple les lectines à N-acétyl-glucosamine se révèlent soit complètement inactives dans la gamme de concentration testée (telle WGA, une lectine non prise en compte dans notre analyse, Rahbé et Febvay, 1993), soit modérément actives comme l'UDA, soit assez toxiques comme la BSII. Cette observation rejoint les conclusions d'études antérieures sur les effets toxiques de lectines de classes différentes vis à vis de coléoptères (Gatehouse *et al.*, 1995b).

Ces premiers résultats montrent que la lectine à mannose-glucose de *Canavalia ensiformis* (ConA) et la lectine à mannose strict du perce-neige (GNA) présentent de bonnes caractéristiques aphidotoxiques *a priori* intéressantes à exploiter en transgénèse. D'autres critères ont renforcé notre choix pour ces deux lectines :

-1) la **ConA** constitue un **modèle très étudié au niveau biochimique**. Nous disposons ainsi d'une littérature abondante concernant son mode d'action *in vivo* ou *in vitro* sur différents tissus ou cellules (en particulier sur l'épithélium de l'intestin moyen de rat) et sur la nature de ses interactions avec les sucres. D'un point de vue pratique également, il nous était plus facile d'obtenir des produits tels que de la ConA fluorescente (ConA-FITC) ou des anticorps anti-ConA ;

-2) la **GNA** quant à elle, possède des caractéristiques qui en font **le meilleur candidat à l'application envisagée** : outre les propriétés aphidotoxiques décrites dans ce chapitre, la GNA est également non toxique pour les mammifères, et son gène est déjà disponible et exprimé dans des plantes transgéniques (pomme de terre, tabac) par nos collègues britanniques, initialement pour sa toxicité sur d'autres familles d'insectes. L'étude du mode d'action de la GNA sur les pucerons est initiée depuis plus d'un an à Durham (Rachel Down, phD) et des travaux sur un autre homoptère (la cicadelle du riz, *Nilaparvata lugens*) ont déjà fait l'objet d'une thèse (Powell, 1993). La comparaison des modes d'action de la ConA et de la GNA est donc rendue possible.

Par ailleurs, si ces deux lectines présentent des propriétés toxiques intéressantes vis à vis du puceron du pois, il était important de déterminer si cette **toxicité** se manifestait sur d'**autres espèces aphidiennes**, en particulier le puceron du melon (l'aphide cible dans le cadre du programme INRA) et des espèces telles que *M. persicae* susceptibles d'être utilisées pour tester des pommes de terre transgéniques. Nous avons donc intoxiqué cinq autres espèces d'aphides à des concentrations de ConA comprises entre 5 et 1500 $\mu g.ml^{-1}$. Nous discuterons de l'intérêt de cette gamme de concentrations d'une façon plus générale dans le dernier chapitre de cette thèse.

Bien que toutes les espèces testées soient fortement affectées à la plus forte concentration appliquée (inhibitions de croissance), nous observons des relations **dose-réponse très différentes**. Deux groupes de pucerons apparaissent clairement. Les plus sensibles d'entre eux sont incapables de survivre jusqu'à l'âge adulte à une concentration supérieure à 750 $\mu g.ml^{-1}$ (*A. pisum* et *M. albifrons*). Cependant dans ce groupe, les réponses aux faibles concentrations (<100 $\mu g.ml^{-1}$) diffèrent sensiblement : *A. pisum* est l'espèce la plus sensible dans toute la gamme de concentrations testées, alors que le seuil de toxicité pour *M. albifrons* se situe au-delà de 100 $\mu g.ml^{-1}$.

Globalement, le profil des courbes d'inhibition de croissance de toutes les espèces testées peut d'ailleurs être divisé en deux, traduisant probablement **deux phases distinctes dans l'intoxication**. Ceci est particulièrement vrai pour *M. persicae* : dans la gamme de concentrations 15-250 $\mu g.ml^{-1}$, les inhibitions de croissance sont significatives mais elles ne diffèrent pas entre elles (plateau de toxicité intermédiaire). Au-delà de 500 $\mu g.ml^{-1}$ la croissance est d'autant plus faible que la concentration est forte. Cette observation explique que l'ajustement par une équation du type logarithmique soit un peu meilleur qu'un ajustement de Michaelis. Ce mécanisme d'intoxication en deux temps se manifeste aussi pour *A. pisum* et *A. gossypii* (même si les degrés d'intoxication ou les plages de seuil d'intoxication ne sont pas les mêmes). Il pourrait être lié à l'existence de **différents types de cibles physiologiques de la toxine**.

Nous observons encore que la sensibilité différentielle des espèces testées vis à vis de la ConA n'est pas liée à leur appartenance à un groupe taxonomique défini de la famille des Aphidinae, l'espèce la plus sensible (*A. pisum*) et l'espèce la plus résistante (*A. solani*) appartiennent à la même tribu des Macrosiphini (Ilharco et van Harten, 1987 - annexe 1A-F). Cependant, ces espèces peuvent être éventuellement regroupées sur la base de leur **spécificité vis à vis de leurs plantes hôtes**. En effet, les deux espèces oligophages s'alimentant uniquement sur Fabacées s'avèrent plus sensibles que les espèces polyphages qui "supportent" mieux de très fortes doses de ConA. L'observation d'une toxicité différentielle de la ConA suivant les espèces aphidiennes ciblées soulève le problème de l'**existence de mécanismes de résistance aux fortes concentrations de toxine**. Nous avons vu dans le chapitre 1 que ce problème est crucial à prendre en compte dans la mise en oeuvre d'une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux insectes.

Nous constatons néanmoins que la croissance est toujours affectée de manière importante aux fortes concentrations de lectine. Une telle situation, si elle était reproduite *in planta*, pourrait donc affecter fortement la dynamique des populations de pucerons, et ainsi le statut hôte d'une variété exprimant le gène de cette toxine. Malheureusement cette situation d'intoxication aiguë *in planta* constitue encore à l'heure actuelle un objectif à atteindre. En effet, les taux d'expression du gène de la GNA dans la sève phloémienne des plantes transgéniques mises à notre disposition semblent encore relativement faibles.

Avant de tester ces plantes avec l'espèce *M. persicae*, nous avons observé les effets induits *in vitro* par la GNA sur ce puceron. Des tests de toxicité conduits simultanément avec la ConA et deux autres lectines à mannose strict, la lectine de l'ail (ASA) et la lectine de la tulipe (NPA), permettent une comparaison intéressante de la toxicité de ces lectines à spécificités osidiques très proches.

Seule la GNA, à la plus forte concentration (1500 $\mu g.ml^{-1}$) a un effet marqué sur la survie (42 % mortalité *vs* 5 % avec la ConA). Cette observation confirme, avec une autre lectine, que

l'espèce polyphage ***M. persicae*** **est moins sensible à la toxicité des lectines à mannose** que l'espèce oligophage *A. pisum*.

En terme de gain de masse, toutes les lectines à mannose testées induisent un effet significativement délétère, en particulier à la plus forte dose. Bien que ces trois lectines soient sérologiquement liées, elles diffèrent par le nombre de sous-unités par molécule. La GNA (protéine tétramérique) s'avère la plus toxique ; les effets de la NPA (protéine trimérique) sont aussi très marqués, alors que l'ASA (protéine dimérique) manifeste une moins forte toxicité. Nos résultats tendraient à confirmer l'hypothèse selon laquelle leur efficacité serait corrélée au nombre de sous-unités les composant. Cette hypothèse est avancée par Powell *et al.* (1995c) qui constatent également des effets différentiels de GNA, NPA et ASA sur la cicadelle du riz, *N. lugens*. Un article récent montre cependant que les propriétés de reconnaissance osidique de la GNA et de la NPA sont légèrement différentes (Kaku et Goldstein, 1992).

De fait, il nous paraît plus probable que les différences de toxicité observées soient liées aux différences d'affinité des lectines pour des oligosaccharides contenant du mannose. Nous abordons plus complètement cette question dans le chapitre 4 consacré au mode d'action des lectines.

L'intoxication aiguë de *M. persicae* nous révèle également que les trois **lectines à mannose** strict provoquent à très faibles doses une **stimulation significative de la croissance** (figure 13). *A contrario*, la ConA à la concentration de 15 $\mu g.ml^{-1}$ induit une inhibition de croissance de 35 %. Il faut cependant rappeler la variabilité des résultats observés aux faibles doses avec la ConA. Ces données sont analysées et discutées dans le chapitre 4. Cette observation a des implications importantes dans une stratégie visant à créer des plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Une expression trop faible dans la sève phloémienne aurait pour conséquence d'augmenter plutôt que de diminuer la croissance des populations aphidiennes.

L'étape ultérieure de notre étude consiste à observer les effets des lectines *in vitro* à des **concentrations** susceptibles d'être **exprimées** dans des **plantes transgéniques**. Le premier test à long terme sur *A. pisum* avec la ConA à des doses sublétales est difficile à interpréter à cause des performances médiocres du lot de pucerons témoins de la deuxième série. Nous constatons cependant que l'intoxication entraînerait une plus grande **longévité** des pucerons.

En terme de dynamique de croissance populationnelle les adultes sur les milieux ConA sont significativement affectés (pour les deux tests), mais le nombre total de larves pondues par les pucerons est identique pour chacune des trois modalités du second test. Ce travail n'a pas été reconduit pour confirmer ou non ces résultats. Du fait des contraintes que ce type d'expérience impose au niveau de la durée, nous avons privilégié l'étude des effets à long terme de la GNA et de la ConA sur *M. persicae*, l'espèce utilisée dans un premier temps pour les tests biologiques sur plantes transgéniques. Une réduction de la fécondité et une altération de la dynamique de reproduction (r_m) est observée sur tous les milieux contenant de la GNA ou de la ConA.

Avec toutes les précautions qui s'imposent, il est possible d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* avec ceux susceptibles d'être observés sur des plantes transgéniques exprimant à un taux élevé le gène de la GNA. Ainsi, sur la base des résultats obtenus sur milieux artificiels, sur une période de 30 jours, la taille d'une population de pucerons sur plantes témoins serait potentiellement multipliée par 1200 environ ($r_m = 0{,}238$), alors que sur des plantes transgéniques exprimant la GNA à 450 $\mu g.ml^{-1}$ (9,4 µM) dans la sève phloémienne, la taille de la population serait multipliée, en une même durée, par un facteur 200 ($r_m = 0{,}176$).

Ce calcul est bien sûr théorique et néglige de nombreuses hypothèses. En particulier, il n'est pas tenu compte de la différence importante de taux d'ingestion dans les deux situations (plante *vs* milieu), ni des possibles interactions toxicité x état nutritionnel, qui pourraient jouer en faveur d'une toxicité accrue sur plante dans la mesure où les milieux artificiels utilisés sont des milieux très riches et équilibrés en azote par rapport à la sève phloémienne (Prosser *et al.*, 1992; Douglas, 1993 ; Calatayud *et al.*, 1994 ; Liadouze *et al.*, 1995). Ces types d'**interaction toxine x nutrition** ont déjà été identifiés pour d'autres insectes avec des inhibiteurs de protéases par exemple (Gatehouse et Boulter, 1983 ; Broadway et Duffey, 1986 ; Burgess *et al.*, 1994), et nous y reviendrons ultérieurement (Chapitre 4 & Discussion finale).

Les premiers **tests biologiques** effectués sur des **pommes de terre transgéniques** s'avèrent **très variables**. *M. persicae* et surtout *A. solani* semblent affectés sur les lignées PWG6#85 et PBG6#47 (tests de juillet 1993 et février 1994) : la présence de la **GNA diminue significativement les dynamiques de fécondité** de ces pucerons en retardant leurs pics de reproduction, entrainant des r_m sur les plantes témoins significativement supérieurs à ceux observés sur plantes transgéniques.

Dans le cas de *M. persicae*, cette différence se traduirait, en 30 jours, par une multiplication théorique par 95 000 de la taille de la population sur les plantes témoins mais seulement de 8 500 à 10 500 sur plantes transgéniques. En comparant ces résultats à ceux obtenus sur milieux artificiels et avec les mêmes précautions que celles avancées précédemment, nous pourrions estimer que la présence de GNA dans la sève phloémienne des plantes transgéniques induirat les mêmes effets qu'une concentration d'environ 300 $\mu g.ml^{-1}$ dans une solution standard Ap2, ce qui semble manifestement très au dessus de la réalité mesurée par les dosages d'intestins de pucerons.

Nous ne discuterons pas ici des éventuels effets additifs ou synergiques de la GNA et de la chitinase du haricot (*A. solani* est particulièrement affecté sur la lignée PBG6#47 exprimant ces deux protéines). Nous ne disposons pas d'informations suffisantes (résultats de tests de toxicité avec BCH et BCH + GNA, par exemple) pour argumenter de tels effets, mais il est certain que les chitinases (exprimées dans ces pommes de terre pour leur pouvoir antifongique) possèdent aussi une toxicité aphidienne, comme cela a été mesuré au laboratoire sur *A. pisum* (Rahbé et Febvay, 1993).

Les résultats prometteurs enregistrés une première fois avec la lignée PWG6#85 n'ont pas été confirmés dans le second test avec *A. solani.* Les lignées transformées récemment créées (constructions simples avec le gène de la GNA) se sont avérées décevantes. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats. Une **variabilité** liée aux **insectes** n'est pas exclue. Nous avons ainsi constaté l'apparition de nombreux ailés dans la population dont sont issus les pucerons utilisés en janvier 1995. Il est possible que parmi ces pucerons certains soient des sexupares.

Les dosages de la GNA dans les extraits de feuilles nous laissent cependant supposer que cette **variabilité** est surtout liée aux **plantes** elles-mêmes. Les lignées testées en janvier 1995 expriment faiblement la GNA : moins de 1 % des protéines totales solubles *vs* 1 à 2 % pour les lignées testées en juillet 1993 (malheureusement nous ne connaissons pas le taux d'expression des lignées testées en février 1994). Même si les résultats des dosages et des tests biologiques présentent une bonne adéquation il serait imprudent d'en tirer des conclusions hâtives.

A l'heure actuelle, en effet, aucun dosage fiable nous a permis de quantifier précisément la GNA dans le compartiment alimentaire des pucerons, les vaisseaux criblés du phloème. Nous ne savons donc pas si la concentration en GNA dans la sève élaborée est réellement différente d'une lignée à l'autre, d'un test à l'autre pour une même lignée. *A fiortiori*, nous ne connaissons pas non plus les quantités de lectine ingérées par les pucerons sur chacune de ces lignées (en fait, plus que le taux d'expression c'est surtout ce dernier paramètre qui nous intéresse).

Une technique pourrait nous permettre de doser la GNA dans la sève phloémienne : la **stylectomie**. Celle-ci consiste à couper les stylets des pucerons en phase d'alimentation et à récolter le flux de sève élaborée exsudant de l'extrémité des stylets sectionnés. Des essais préliminaires effectués dans notre laboratoire[57] ont montré la faisabilité de cette approche : 10 à 20 nl de sève peuvent en effet être récoltés à chaque prélèvement, ce qui est quand même une situation assez défavorable par rapport à d'autres couples plante/puceron (Girousse *et al.*, 1991). Dans une plante exprimant la GNA à une concentration de 200 $\mu g.ml^{-1}$ de sève, 2 ng de protéines sont ainsi récoltables et quantifiables par Dot Blot ou ELISA. Pour l'heure, nous sommes confrontés à un problème pratique de mise en oeuvre de cette technique au laboratoire de nos collègues britanniques (inversement, nous ne disposons pas des

57 Avec *A. solani* et *M. euphorbiae* sur pomme de terre Désirée.

autorisations nécessaires pour expérimenter leurs plantes transgéniques dans notre laboratoire).

Cependant, la sensibilité de cette méthode ne permettra que des mesures approximatives du taux d'expression de la GNA, excluant donc de mettre en évidence une éventuelle **variation** de cette **expression**. Or, ce dernier point est essentiel à préciser. Nous ne savons pas, par exemple, si le taux d'expression varie en fonction de l'âge des plantes. Il est possible que la variation de l'expression soit très différente d'une lignée à l'autre. Les conditions de multiplication des transplants exclue *a priori* une variabilité intralignée (Gatehouse, communication personnelle).

Toutes ces interrogations soulignent l'importance des travaux visant à trouver un **promoteur phloème-spécifique** pour viser plus précisément les insectes phloémophages que sont les pucerons (Gatehouse *et al.*, 1995b).

Chapitre 3

Effet des lectines sur le comportement alimentaire des pucerons

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous abordons la première étape de notre étude visant à caractériser le mode d'action des lectines sur les pucerons. Avant de nous intéresser aux conséquences physiologiques de l'ingestion de lectines à mannose/glucose (chapitre 4), nous avons recherché les effets sur le comportement d'alimentation des pucerons. Cette approche vise à répondre à un objectif principal : formuler des hypothèses expliquant le mode d'action de la Concanavaline A au niveau tissulaire et permettant de fixer les orientations de notre travail.

Il faut signaler ici que dans le courant de notre travail de thèse, nos collègues de Durham avaient mis en évidence un effet de la GNA sur l'ingestion de la cicadelle *N. lugens* (Powell *et al.*, 1995b), et émis l'hypothèse que ces lectines pouvaient agir en tant qu'antiappétants ("anti-feeding compound"). Il nous a donc semblé, pour des raisons que nous discuterons en fin de chapitre, qu'il était essentiel de mieux caractériser les données relatives à ce type d'effet, tant au point de vue des doses utilisées, de la dynamique de la réponse que de la finesse de la description de l'altération comportementale.

Trois techniques complémentaires sont donc mises en oeuvre, notamment pour répondre à une question récurrente dans ce chapitre : les pucerons, et *A. pisum* en particulier, sont-ils capables de "détecter" (dans l'acceptation sensorielle du terme) la présence d'une lectine dans leur alimentation ? Des tests dits "**tests de choix**" sont utilisés pour mettre en évidence un éventuel comportement de rejet de milieux contenant de la ConA. Nous avons ensuite incorporé un **traceur radioactif** dans des milieux contenant la lectine pour mesurer l'ingestion de pucerons intoxiqués et décrire la cinétique de l'intoxication. Enfin, la technique d'**électropénétrographie**, mise en oeuvre ici en milieu artificiel, nous permet une analyse fine des différentes séquences du comportement d'alimentation induites par l'intoxication.

2. Matériels et Méthodes

2.1. *Acyrthosiphon pisum* et la Concanavaline A : le puceron et la lectine modèles testés

Tous les tests décrits dans ce chapitre ont porté sur des larves ou des jeunes adultes de l'espèce *A. pisum*. Les lots de pucerons sont homogénéisés par synchronisation avant le transfert sur les milieux artificiels. La Concanavaline A provient de chez EY Laboratories (San Mateo, CA USA, réf. L-1104). Elle se présente sous forme de poudre que nous stockons à -20°C. Les milieux artificiels avec ConA sont préparés par dilutions d'une solution mère de milieu standard Ap2 contenant 1 $mg.ml^{-1}$ de lectine (matériels & méthodes du Chapitre 2).

2.2. Principe des micro-tests de choix

Nous avons élaboré[58] un dispositif permettant de tester le comportement de choix de larves de l'espèce *A. pisum* mises en présence de deux milieux artificiels de compositions différentes (par exemple l'un contenant de la ConA, l'autre pas). De nombreuses exigences ont dû être

[58] en association avec J.Q. Chen, un thésard du laboratoire qui travaille sur un autre modèle plante-puceron.

remplies et testées pour que ce test de choix soit fiable. Le dispositif décrit sur la figure 23 est le meilleur compromis que nous ayons trouvé pour répondre à ces exigences :

- l'espace dans lequel les larves sont transférées est confiné (10 x 10 mm) mais n'entraîne pas de gêne ; même très mobiles, celles-ci se fixent donc rapidement sur l'un ou l'autre des milieux ;

- les deux milieux sont suffisamment proches pour que les larves puissent éventuellement se déplacer de l'un vers l'autre avant de faire leur choix (comportement d'épreuve caractéristique des pucerons),

- dans chaque configuration de choix, vingt à vingt-quatre lots de pucerons sont testés pour que les résultats soient statistiquement exploitables ;

- les larves fixées sur l'un ou l'autre des milieux peuvent être comptées à différents intervalles de temps (15 min à 48 h) sans qu'elles soient perturbées, en regardant par l'extrémité coupée de l'eppendorf ;

- le nombre de larves dans chaque lot (n = 6) est défini de manière que les différences entre les taux de fixation soient statistiquement discernables.

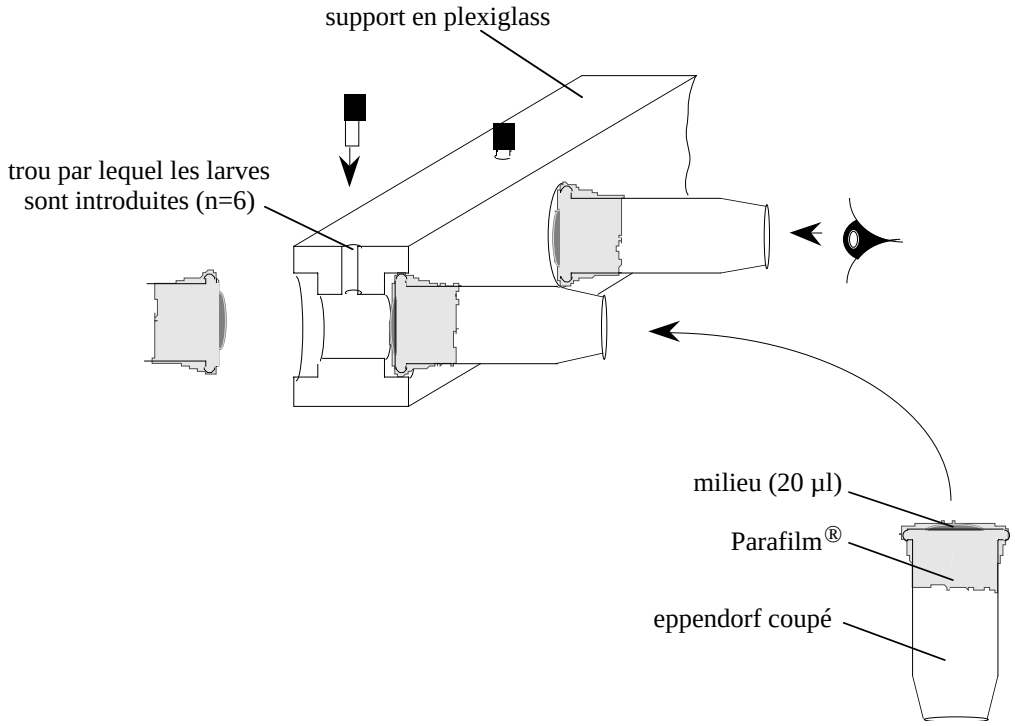


Figure 23 - Dispositif mis en place pour tester les larves de l'espèce A. pisum *en condition de choix entre deux milieux de compositions différentes.*

Les tests sont effectués avec 2 x 20 (ou 24) milieux. Les milieux d'une même composition sont disposés en alternance. Pour une cage, nous notons (+) lorsque nous dénombrons plus de la moitié des larves fixées sur le milieu témoin, (-) dans le cas contraire et (=) en cas d'égalité. La discrimination "milieu témoin-milieu testé" se fait par un test des signes (la puissance de ce test est relativement faible, mais la présence d'un effet de groupe[59] ne nous permet pas d'utiliser l'individu comme unité de répétition, ni même un test des rangs signés).

59 Comportement d'agrégation des larves, indépendant d'une préférence mesurée pour un milieu.

2.3. Mesure du taux d'ingestion des pucerons

Le taux d'ingestion des pucerons sur milieux artificiels, autrement dit le volume de milieu (en nl) ingéré par heure, est calculé à l'aide d'un marquage en ^{14}C à l'inuline[60]. Le principe de cette méthode est décrit par Wright *et al*. (1985) et a été adapté à *A. pisum* au laboratoire (Rahbé *et al.*, 1988). Nous avons ainsi déterminé le taux d'ingestion d'adultes et de jeunes larves de l'espèce *A. pisum* intoxiqués avec de la Concanavaline A.

2.3.1 - Taux d'ingestion d'adultes de l'espèce **A. pisum** *intoxiqués par la ConA*

Des larves néonates sont laissées sur milieux Ap2 jusqu'à leur mue imaginale. Dix jeunes adultes par modalité sont transférés dans des cages individuelles sur des milieux contenant 0, 200, 400 ou 800 µg.ml^{-1} de ConA et de l'inuline marquée (hydroxy [^{14}C] méthyl, 6.8 mCi.g^{-1}, réf. Sigma) à la concentration de 9 µCi (333 kBq).ml^{-1} (soit environ 20 cpm.nl^{-1}). Chaque milieu est préparé en coulant 10 µl de solution Ap2 (avec ou sans ConA) entre deux feuilles de Parafilm® sur un support cylindrique de 9 mm de diamètre :

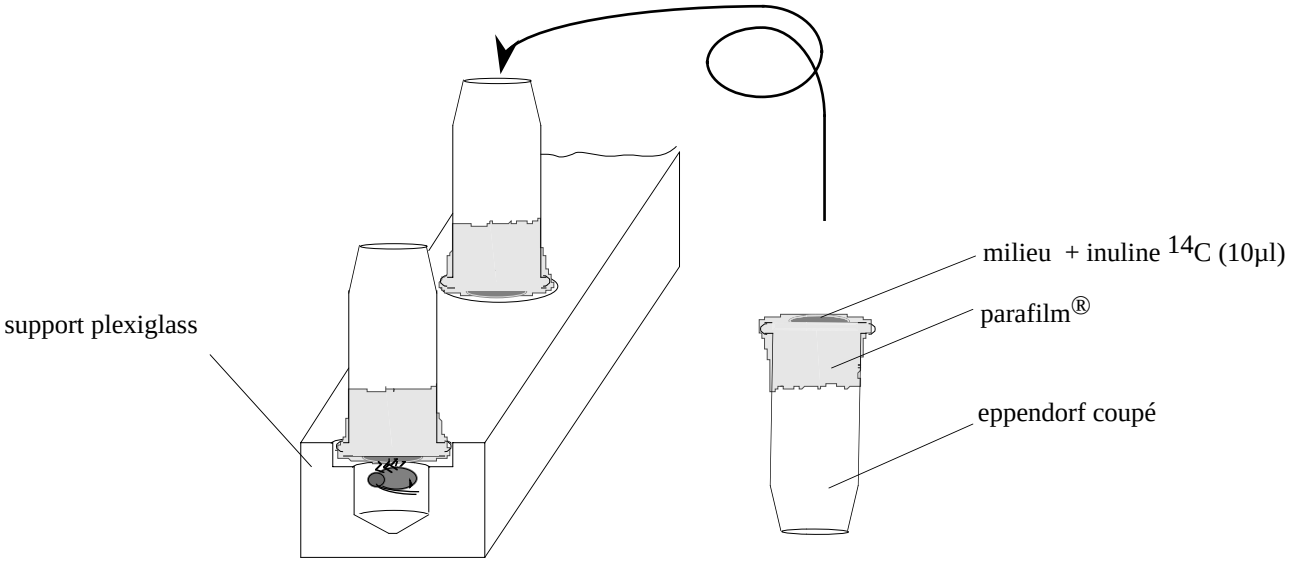


Figure 24 - Dispositif mis en place pour mesurer individuellement les quantités de milieux marqués à l'inuline ^{14}C ingérées par des pucerons (larves ou adultes).

Après 24 h, les larves pondues sont supprimées avec un pinceau en évitant de perturber les adultes. Au bout de 48 h, les larves sont supprimées[61] et les miellats sont collectés à l'eau distillée. Miellats et pucerons sont poolés et digérés dans 200 µl de soluène (Soluène 350, Packard) pendant 24 h (fiche-protocole N°15). Les extraits sont ensuite neutralisés avec 50 µl d'acide acétique glacial et mis à compter dans 4,5 ml de liquide à scintillation (Emulsifier Scintillator 299, Packard) avec une fenêtre ^{14}C de précomptage de 80 % d'efficacité et affichant un bruit de fond de 20 cpm. Le calcul de la radioactivité intègre ce bruit de fond et le signal recueilli pour un échantillon “froid” (puceron, scintillant, soluène, eau, acide acétique ≈ 25 cpm).

La radioactivité de dix échantillons de 100 nl de milieu standard marqué est mesurée. La moyenne calculée sur ces dix échantillons permet de convertir la radioactivité mesurée pour chacun des extraits de pucerons en nl de milieu ingéré. Les quantités moyennes de milieu

60 Composé non assimilable et métabolisable, utilisé pour mesurer l’ingestion ou les volumes d’hémolymphe chez différents insectes.

61 Nous considérons le volume de miellat rejeté par les larves comme négligeable par rapport à celui de l'adulte : la radioactivité totale mesurée est donc, selon notre raisonnement, la somme de la radioactivité du puceron et de celle de son miellat.

ingérées par les pucerons de chacune des modalités sont comparées (n=10, ANOVA, test de Bonferroni/Dunn) pour mettre en évidence l'effet des différentes concentrations de lectines.

*2.3.2. Taux d'ingestion des larves d'***A. pisum** *intoxiquées par la ConA*

Des larves âgées de 1 à 2 h sont transférées sur des milieux Ap2 simples ou contenant 400 µg.ml^{-1} de ConA. Elles sont laissées pendant 22 h sur ces milieux. A l'issue de ce pré-traitement, dix larves de chaque lot (préalablement intoxiquées ou non) sont mises à jeûner 2 h [62] puis transférées individuellement sur des milieux contenant de l'inuline marquée à la concentration définie précédemment. Dix autres larves de ces mêmes lots sont déposées sur des milieux contenant de l'inuline marquée et de la ConA à 200 µg.ml^{-1}. Ces quarante premières larves sont laissées 1 h sur leurs milieux respectifs. Simultanément d'autres lots sont préparés pour tester des durées d'ingestion de 2 h, 4 h, 8 h et 16 h.

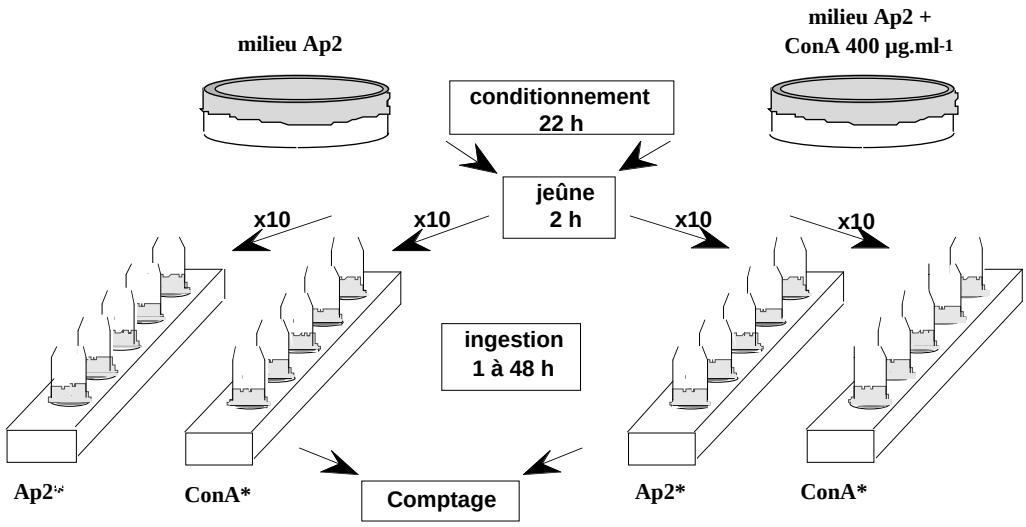


Figure 25 - Protocole pour mesurer les quantités de milieu marqué ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum,* préalablement intoxiquées ou non.
Les quantités ingérées sont mesurées pour des temps d'ingestion compris entre 1h et 48h.

Une seconde expérience indépendante de celle que nous venons de décrire est conduite selon le même protocole à l'exception près que les durées d'ingestion s'échelonnent de 2 h à 48 h et que la concentration de ConA, dans le milieu marqué est doublée (400 µg.ml^{-1}). La radioactivité totale des larves et de leur miellat est déterminée en suivant la méthode détaillée dans la fiche-protocole N°15.

Les quantités moyennes de milieu ingérées par les pucerons dans chacune des configurations de l'expérience sont comparées par des tests paramétriques classiques (ANOVA, test de Bonferroni/Dunn). Pour les durées courtes d'ingestion (2 h - 8 h), les individus qui ont mué ne sont pas pris en compte dans l'analyse. Pour les durées plus longues, les individus qui manifestement ne se sont pas fixés (relevés toutes les 4 h), du fait d'un stress lié à leur manipulation par exemple, sont considérés comme "individus aberrants" et supprimés de l'analyse.

---

62 Ce jeûne permet d'obtenir une meilleure fixation des larves. Qui plus est, après transfert, elles sont laissées dans l'obscurité totale le temps de l'expérience. Dans ces conditions les pucerons sont moins mobiles.

2.4. Technique d'électropénétrographie ou EPG

2.4.1. Données générales

L'électropénétrographie est une technique de plus en plus utilisée par les aphidologistes. Elle permet de répondre à de nombreuses questions fondamentales sur le comportement d'alimentation des insectes phloémophages en général (pour revue Tjallingii, 1988a) De plus, l'EPG est un outil adéquat pour mettre en évidence, dans certains cas, les mécanismes de résistance mis en jeu par les plantes non-hôtes ou résistantes à ces insectes (pour exemples Van Helden, 1995). Nous avons transposé cette technique à l'étude du comportement d'alimentation de pucerons de l'espèce *A. pisum* sur des milieux artificiels contenant de fortes concentrations de Concanavaline A. Bien que des expériences d'EPG sur milieu artificiel aient déjà été réalisées (Van Helden, Tjallingii, communication personnelle), aucun de ces travaux n'a été publié et il existe donc encore très peu de supports d'analyse des signaux obtenus dans ces conditions, trés différents bien-sûr de ceux enregistrés *in planta*. Avant de revenir plus en détail sur les matériels et méthodes utilisés dans le cadre de notre étude, il nous semble nécessaire de décrire le principe de l'EPG.

Les pièces buccales des pucerons sont constituées de stylets capables de pénétrer dans les tissus végétaux pour atteindre les tubes criblés du phloème (figures 2, 3 et 26) :

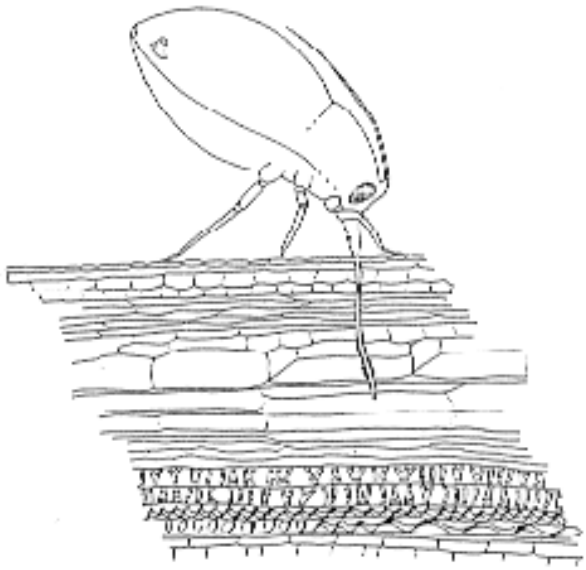


Figure 26 – Représentation schématique d'un puceron en position de recherche de nourriture sur une feuille.

Ce comportement d'alimentation a vivement intéressé les entomologistes car il ne se limite pas, en fait, à une simple recherche de nourriture et à une salivation mais inclut des activités variées et complexes telles que le mouvement des stylets, la salivation et des interactions avec le végétal (Tjallingii, 1988b).

La plupart des connaissances acquises jusqu'au début des années 1970 sur le cheminement des stylets, sur les réponses du végétal et sur les sécrétions des pucerons ont été formulées à partir de résultats expérimentaux obtenus par des techniques qui ont apporté des preuves partielles (coupes histologiques) ou indirectes (stylectomie) (Miles, 1987). Mais, des observations en microscopie électronique sur l'ultrastructure fine des tissus et des cellules traversés ont montré les limites des observations réalisées en microscopie optique (Tjallingii et Hogen Esch, 1993).

L'électropénétrographie (EPG) est une technique relativement récente qui a permis d'apporter de nouvelles informations relatives au comportement de pénétration des stylets des

pucerons. Elle est décrite sous ce terme par Tjallingii en 1978. C'est un prolongement innovateur de la technique initiale inventée par McLean et Kinsey (McLean et Kinsey, 1964; McLean et Kinsey, 1965).

L'EPG est basée sur le fait que les activités de pénétration engendrent des activités ou modifient des signaux électriques exogènes traversant les canaux des stylets, de l'extrémité de ces stylets à la cavité de la pompe salivaire. Ce sont ces signaux, endogènes ou non, que l'on enregistre une fois amplifiés et qui apparaissent sous forme d'ondes sur un "graphe électrique de pénétration" ("electrical penetration graph" ou EPG). La figure 27 décrit très schématiquement le dispositif d'enregistrement d'ondes induites par des pucerons s'alimentant sur milieu artificiel :

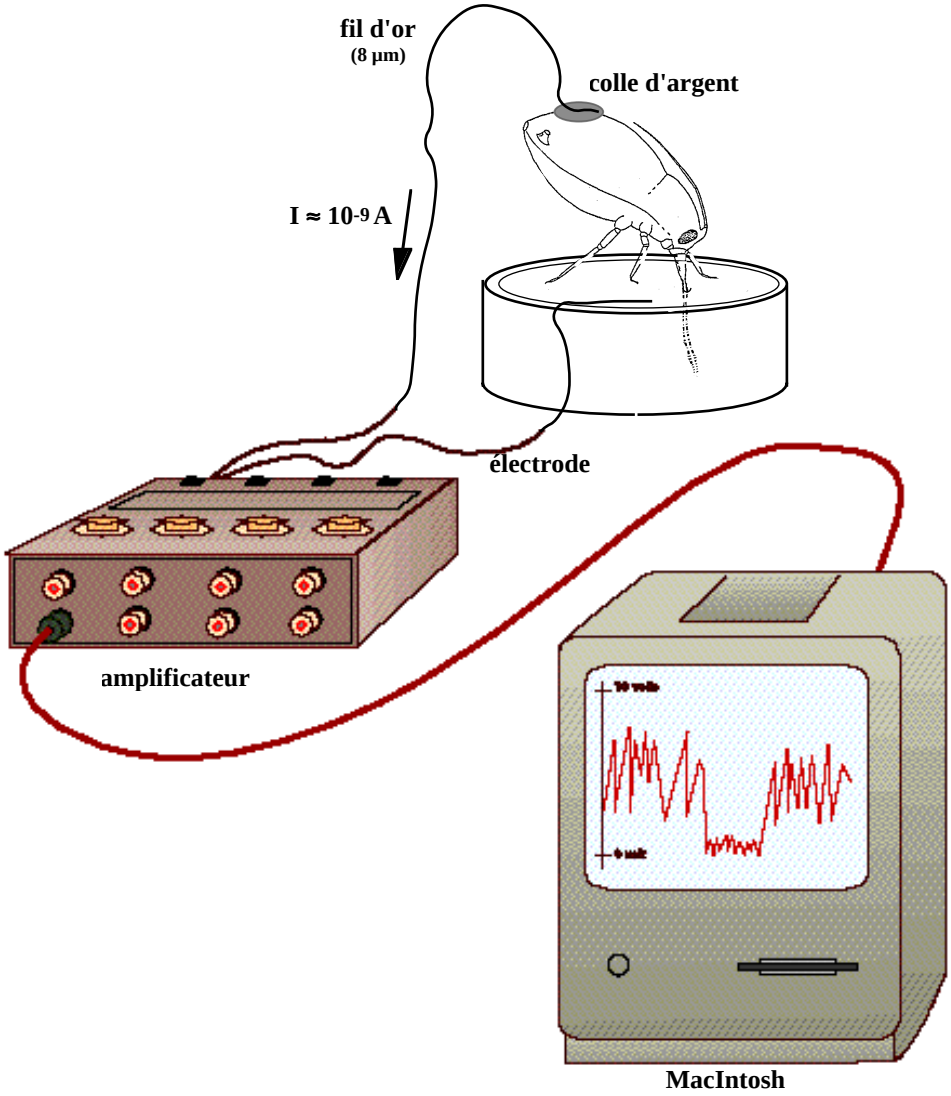


Figure 27 - Schéma simplifié du circuit électrique d'enregistrement d'un EPG sur milieu artificiel.

McLean et Kinsey (1967) avaient distingué 4 types d'ondes différents sur les amplificateurs en courant alternatif, mais l'EPG, basée sur une analyse en courant continu, est en fait bien plus résolutive. Tjallingii distingue actuellement au moins huit types d'ondes, chacune étant caractéristique d'une activité de pénétration précise dans les tissus d'un végétal : contact des stylets avec l'épiderme (ondes A), salivations (ondes B et E2p), ponction dans les cellules du parenchyme (ondes pd), ingestion passive dans le phloème (E2w), ingestion active dans le xylème (ondes G) (annexe 6). A partir de ces données, nous avons interprété les différentes phases d'alimentation d'*A. pisum* sur milieu artificiel.

2.4.2. Mode d'acquisition du signal

L'acquisition du signal électrique est réalisée grâce à la carte d'acquisition MacADIOS SCSI (convertisseur analogique/numérique 12 bits, GW Instruments, Inc., USA). Les activités de quatre pucerons sont enregistrées simultanément (amplificateur EPG-Giga-4 voies, réf. Université de Wagenigen, Pays-Bas). Les données sont stockées sous forme de fichiers binaires. Elles sont lues instantanément par un logiciel en basic élaboré au laboratoire qui permet de visualiser en direct sur l'écran d'un MacIntosh le comportement d'alimentation des pucerons (G. Bonnot, non publié). L'acquisition est réalisée ici à la fréquence de 10 Hz (10 points par seconde). Cette fréquence est suffisamment résolutive dans notre protocole expérimental pour l'analyse ultérieure des profils EPG, et permet des enregistrements de longue durée sans que nous soyons confrontés à des problèmes de capacité de stockage des données[63].

2.4.3. Méthode d'analyse du signal

L'analyse du signal électrique est réalisée à l'aide du logiciel MacStylet™ développé au laboratoire (Febvay *et al.*, 1992). Pour chaque puceron, le début des différentes phases des ondes EPG observées est étiqueté grâce à une marque spécifique ; le début d'une phase correspondant automatiquement au début de la suivante ou à la fin du signal (annexe 7B). Chaque marque est alors définie par : son type (np, C, G) ; son abscisse, c'est à dire le temps où se situe cette marque depuis l'origine de l'enregistrement, et son ordonnée, c'est à dire le niveau en volt du signal électrique à ce temps. Les paramètres de toutes les marques affichées sur un enregistrement sont sauvegardés dans un fichier indépendant pour être relus avec un tableur (Excel®) puis un logiciel de calculs statistiques (Statview®). La fonction statistique intégrée de MacStylet™ nous permet également de calculer les variables classiquement utilisées pour l'analyse d'un enregistrement EPG (annexes 7A et 7B).

2.4.4. Protocole de mise en oeuvre de l'EPG sur milieu artificiel

Neuf jours avant l'enregistrement EPG, des larves néonates issues d'une population synchronisée de pucerons de l'espèce *A. pisum* sont déposées sur des milieux standards Ap2. Huit jours plus tard, la veille au soir de l'enregistrement, dix jeunes adultes issus de cette ponte sont précautionneusement câblés : ils sont maintenus immobiles à l'extrémité d'un embout plastique par une légère aspiration ; nous pouvons alors, sous une loupe binoculaire, coller un fil d'or[64] (18 µm, longueur ≈ 3 cm) sur les tergites abdominaux de l'insecte à l'aide d'une laque aqueuse à l'argent[65]. Les antennes, les pattes, les cornicules ne doivent pas être encollées. Les pucerons stressés (émission d'une goutte de phéromone d'alarme à l'extrémité des cornicules, agitation excessive) sont supprimés. Chaque puceron branché est ensuite laissé une nuit sur un milieu standard.

Nous avons dû mettre au point un dispositif particulier pour adapter la technique EPG, habituellement utilisée pour des enregistrements sur plantes, à des mesures sur milieu artificiel (annexe 8). Le matin de l'enregistrement les milieux artificiels sur lesquels les pucerons vont être testés sont coulés. Quatre pucerons sont ensuite connectés au circuit. Après quelques minutes, les insectes qui refusent de se stabiliser dans la cage et de se fixer sont remplacés.

L'acquisition débute lorsque tous les pucerons semblent en position de piqûre (pattes écartées, antennes immobiles). En cours d'acquisition, le puceron qui ne pique pas pendant plus de 2 heures (puceron ayant du mal à se fixer) est remplacé (situation indépendante d'une

---

63 La fréquence de 100 Hz est très généralement utilisée pour les études sur plantes. Mais un fichier de 1h représente 700 Ko. A 10 Hz, un fichier de cette taille contient 10 h d'informations.

64 réf. Degussa-Demetron, Courbevoie, France.

65 réf. Degussa-Demetron, type L2027.

éventuelle intoxication). L'acquisition est stoppée le lendemain lorsque, pour les pucerons qui continuent de s'alimenter, l'enregistrement a duré au moins 24 heures. Quatre à huit pucerons sont ainsi enregistrés par acquisition.

Au cours de deux expériences indépendantes, vingt à trente adultes sont testés successivement sur des milieux contenant de la Concanavaline A à 400 µg.ml^{-1} et à 600 µg.ml^{-1}. A chaque acquisition, deux pucerons sont déposés sur des milieux standards, deux autres sur des milieux lectines. Le nombre exact d'insectes testés est donné dans les tableaux de résultats. Chaque jour, un nouveau lot de jeunes adultes est utilisé. Tous les résultats se rapportent donc à des pucerons âgés de 9 jours exactement.

2.4.5. Analyse des données EPG

Onze variables (ou paramètres) sont considérées pour analyser le comportement d'alimentation des pucerons et sont définies plus loin (tableau 15). Afin de mettre en évidence les effets de l'intoxication au cours du temps, les analyses statistiques portent sur trois durées d'enregistrement pour chaque puceron : 4 , 8 et 24 heures[66]. Une première approche (analyses univariées) concerne la capacité de chacune des onze variables à discriminer significativement les deux lots de pucerons. Les données se rapportant à chaque lot sont comparées par un test U de Mann-Whitney.

Une analyse en composantes principales normée (ACPn) est exécutée sur les données se rapportant aux enregistrements de 24 h des pucerons du test avec la lectine à 600 µg.ml^{-1}. Seules cinq variables permettant de discriminer les pucerons intoxiqués, des non-intoxiqués sont prises en compte dans l'analyse. Tous les calculs et les graphiques sont issus du logiciel ADE 3.6 (Chessel et Dolédec, 1994). Les figures sont regroupées et mise en page sous MacDrawPro®.

Deux modules d'ADE (HistoClass et Gaussclass) tracent pour chaque variable et chaque lot de pucerons, les histogrammes et les courbes de Gauss (ce dernier descriptif graphique est donné en annexes 9A à 9F), permettant d'interpréter plus aisément les profils des enregistrements EPG obtenus.

66 Chaque durée s'entend depuis le temps To correspondant à la première marque C (tableau 15).

3. Résultats

3.1. La Concanavaline A est-elle phagorépulsive ?

3.1.1. Première réponse apportée par les microtests de choix

Un premier test comportemental a été mis au point pour mettre en évidence un éventuel effet phagorépulsif de la ConA. La figure 28 illustre les résultats obtenus avec des larves mises en condition de choix entre deux milieux Ap2 (A), et entre du milieu Ap2 et du milieu contenant 400 µg.ml^{-1} d'acide chlorogénique (B) ou de Concanavaline A (C).

La figure 28A montre la fiabilité du test : au bout d'une heure, près de 60 % des larves sont déjà fixées sur l'un ou l'autre des milieux Ap2, et 83 % le sont au bout de deux heures. Le taux de fixation maximum est atteint à la vingtième heure. Il existe donc un temps de latence de 2 heures environ avant que la majorité des larves se fixent. Certes, il peut sembler très court, mais nous verrons ultérieurement qu'il est important d'en tenir compte dans l'interprétation de certaines de nos observations (voir paragraphe consacré à l'EPG sur milieux artificiels notamment). Les larves se répartissent indifféremment sur les deux milieux, et ce, dès la première heure. Les six larves de chaque lot ne montrent donc pas de tendance à l'agrégation. Ce point était important à confirmer pour nous éviter une mauvaise interprétation des résultats.

La figure 28B illustre la réaction caractéristique des pucerons mis en présence d'une **substance phagorépulsive**. En moins d'une heure les larves se fixent préférentiellement sur les milieux Ap2 (p = 6,3 %). Au bout de deux heures, le rejet des milieux contenant l'acide chlorogénique est encore plus manifeste (p = 0,5 %). Cette substance n'est pas toxique pour les pucerons[67], et on peut noter que le taux de fixation global est sensiblement identique à celui du test précédent avec les deux milieux Ap2. Autrement dit, certaines larves après avoir goûté au milieu contenant l'acide chlorogénique, manifestent simplement un comportement de rejet immédiat, choisissent le milieu témoin sans ambiguïté et s'y fixent à long terme.

Quelques larves sont dénombrées lors des relevés sur les milieux "acide chlorogénique" : il s'agit : soit de larves fixées insensibles, ou moins sensibles, aux effets de la substance répulsive, soit plus probablement de larves mobiles mais semblant fixées au moment du relevé ; elles sont en nombre trés réduit (< 3 %) en fin d'expérience, tout comme les larves non fixées (0 %).

Les résultats obtenus avec la **ConA** sont **très différents**. Sur milieux Ap2, le nombre de larves fixées n'est significativement supérieur que vers 8 à 10 h après l'introduction des insectes (2 h, p = 13% ; 4 h, p = 21% ; 6 h, p = 31% ; 8 h, p = 6,4% ; 12 h, p = 2,3 %). Nous constatons également que même au dernier relevé (48 h), 20 % environ des larves sont fixées sur les milieux ConA et dix autres pour-cent ne sont fixées sur ni l'un ni l'autre des milieux. Sur ces deux points, cette situation diffère complètement de celle observée avec l'acide chlorogénique.

Ces résultats nous amènent à supposer que malgré la tendance à choisir les milieux qui en sont dépourvus, **la ConA n'est pas phagorépulsive** pour les pucerons. Après un certain laps de temps il semble évident que les pucerons soient perturbés, mais deux cas de figures peuvent alors se présenter :

- soit les pucerons "réalisent" que ce qu'ils ingèrent les perturbe et ils arrêtent d'ingérer le milieu incriminé (ce qui suppose une capacité de discrimination de la ConA ou une association avec la toxicité) ;

---

67 Confirmé par une expérience classique de toxicité à cette dose, en situation de non choix.

page blanche

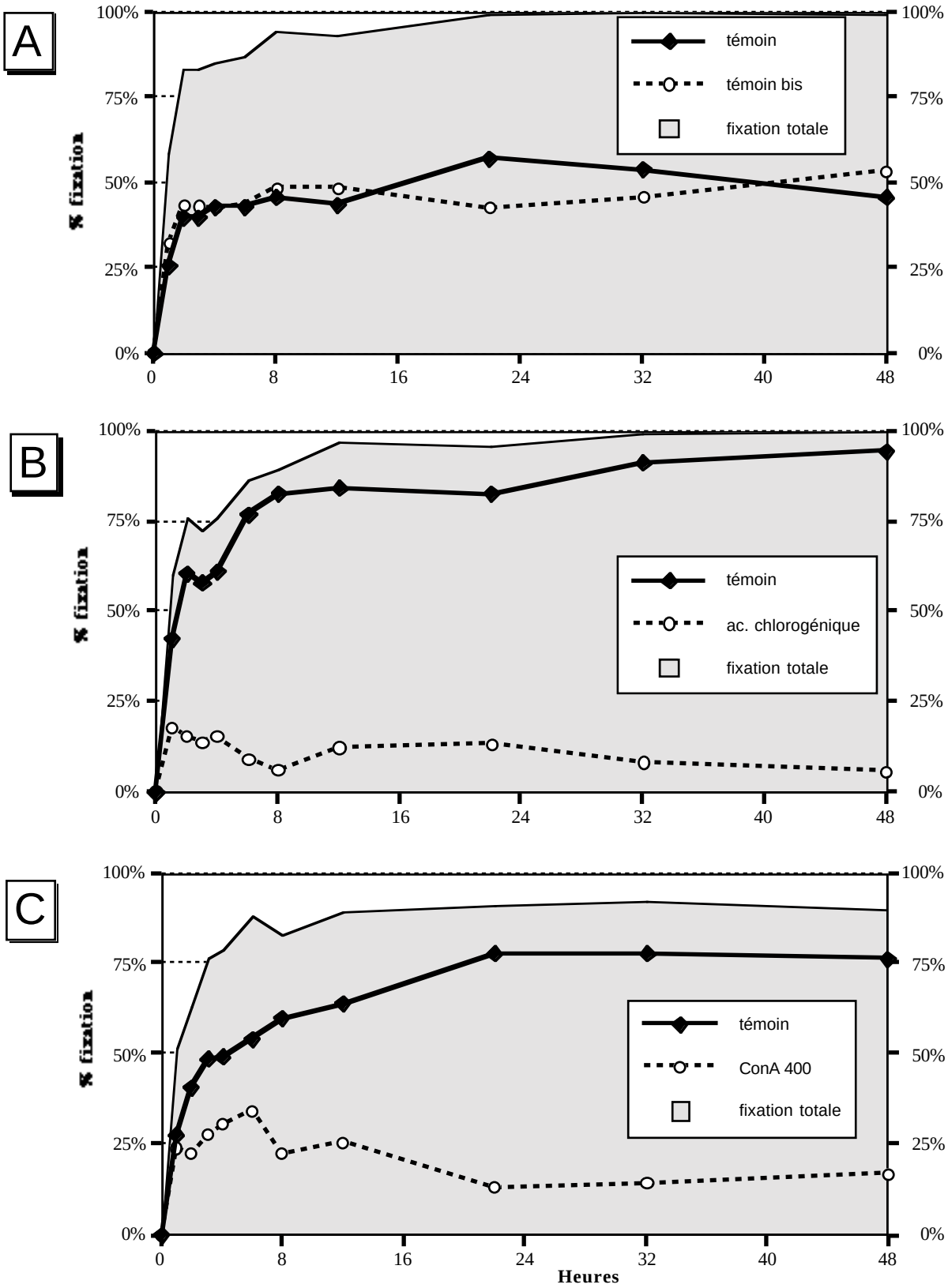


Figure 28 - Comportement de larves de l'espèce *A. pisum* mises en condition de choix entre deux milieux de compositions différentes :
A. milieu Ap2 *vs* milieu Ap2,
B. milieu Ap2 *vs* milieu Ap2 + 400 µg.ml^{-1} d'acide chlorogénique,
C. milieu Ap2 *vs* milieu Ap2 + 400 µg.ml^{-1} de Concanavaline A.

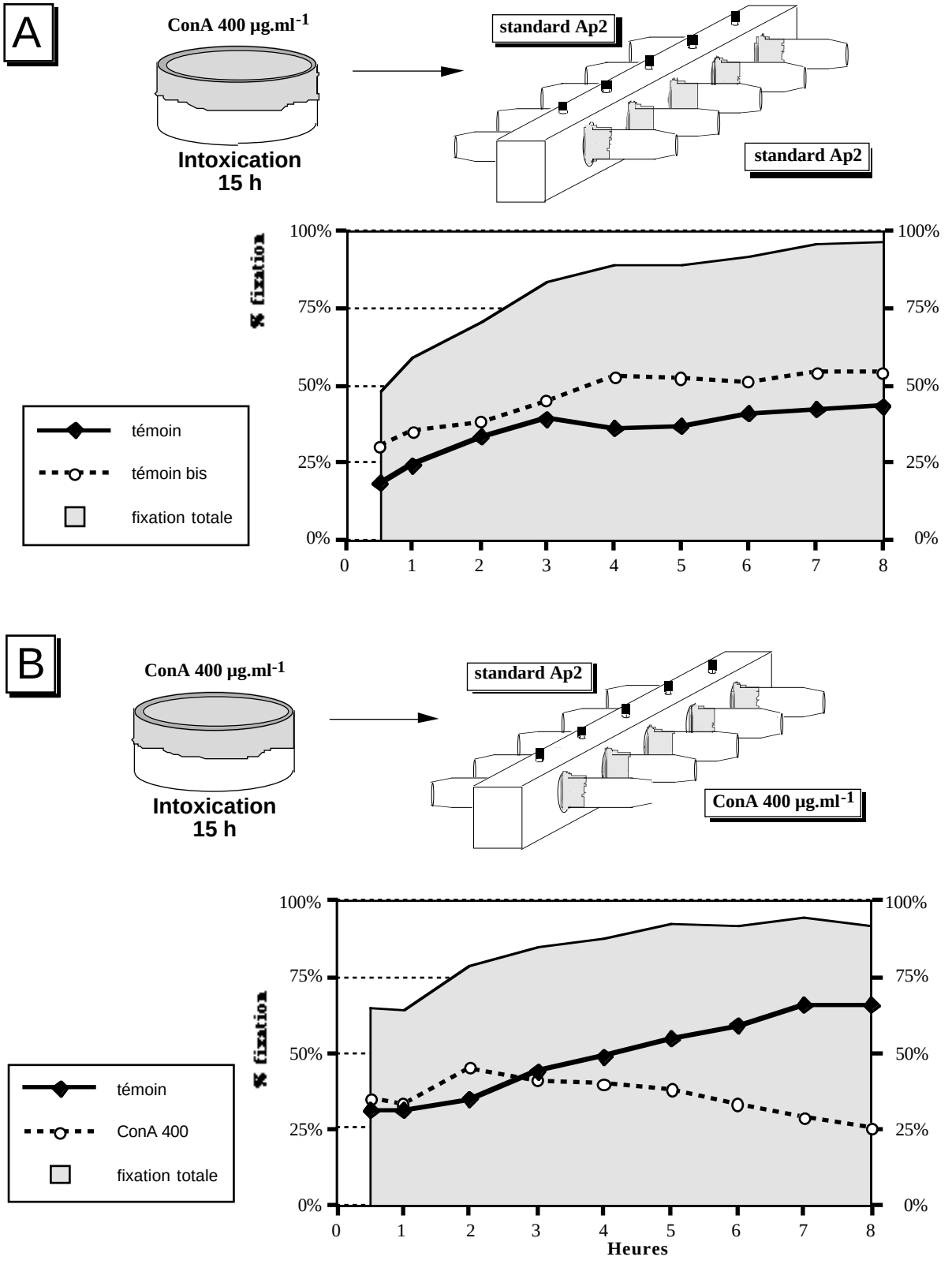


Figure 29 - Comportement de larves de l'espèce *A. pisum* intoxiquées par de la Concanavaline A à 400 µg.ml-1 puis mises en condition de choix entre deux milieux de compositions différentes :
A. milieu Ap2 *vs* milieu Ap2,
B. milieu Ap2 *vs* milieu Ap2 + 400 µg.ml-1 de Concanavaline A.

- soit ils ne font pas cette association, et continuent de s'alimenter jusqu'au moment où les quantités de lectines ingérées sont telles que les effets toxiques les affectent profondément au point de les obliger à s'arrêter de se nourrir et de les faire répartir sur tous les milieux sans discrimination. A long terme, cela conduit à une localisation progressive sur les milieux dépourvus de ConA, mais sans choix clair (ce qui est observé).

Cette dernière hypothèse nous semble la plus plausible au vu des microtests de choix, mais deux nouveaux protocoles ont été élaborés pour la confirmer.

3.1.2. Réponse apportée par les tests de conditionnement

Deux lots de larves sont déposés sur des milieux standards contenant 400 µg.ml^{-1} de Concanavaline A (figure 29). Elles sont ainsi intoxiquées pendant une nuit (≈ 15 h). Les larves du premier lot (6 larves x 24 répétitions) sont ensuite mises en condition de choix entre du milieu Ap2 et du milieu ConA (400 µg.ml^{-1}). Si les larves détectent de manière gustative la ConA, elles devraient rapidement la reconnaître et se fixer préférentiellement sur le milieu Ap2. Un second lot de larves est mis en présence de deux milieux standards identiques (témoins).

La figure 29A montre que des larves même fortement intoxiquées se fixent rapidement et indifféremment sur les deux milieux Ap2. Les pourcentages de fixation aux différents intervalles de temps sont identiques à ceux notés dans le test précédent avec l'acide chlorogénique (figure 28A). Il apparaît sur la figure 29B que les larves intoxiquées se fixent indifféremment sur les milieux Ap2 ou sur les milieux ConA jusqu'au cinquième relevé, au-delà les larves se retrouvent fixées préférentiellement sur les milieux Ap2 (5 h, $p < 5$ %). Nous pouvons aussi signaler qu'au dernier relevé (8 h), 25 % des larves sont encore fixées sur les milieux ConA. Ce test confirme que la lectine n'est pas phagorépulsive et que les larves fixées sur les milieux ConA ne les délaissent que lorsqu'elles sont trop intoxiquées, et non pas par le biais d'une reconnaissance gustative (par essence rapide) de la ConA. Cette interprétation est corroborée par le fait que les larves fortement intoxiquées quittent plus vite les milieux ConA (différence significative dès la cinquième heure de ce test) que les larves non intoxiquées (différence significative à la huitième heure, figure 28C).

Les **larves** sont intoxiquées, mais elles **ne reconnaissent pas la lectine**. La question suivante à laquelle nous voulions répondre était de savoir si les pucerons étaient capables de faire l'association entre le goût de ce qu'ils ingèrent et son caractère toxique.

Un lot de larves est déposé sur des milieux standards Ap2 contenant 400 µg.ml^{-1} de ConA (figure 30B), alors qu'un second lot est déposé sur des milieux Ap2 simples. En vertu de nos observations précédentes, les deux types de milieux ont le même goût pour les pucerons. Après une nuit, les pucerons sur milieux ConA sont perturbés[68], signe de leur intoxication alors que les autres ne le sont pas. Ils sont alors tous mis en condition de choix entre du milieu Ap2 et une solution de saccharose 10 %. Celle-ci est moins riche du point de vue nutritif que le milieu standard mais elle est bien acceptée par les larves[69]. Si les pucerons sont capables de faire l'association entre leur perturbation et le milieu qu'ils ingèrent, nous devrions constater qu'ils choisissent préférentiellement la solution de saccharose (du moins dans un premier temps).

---

68 Les larves sont très mobiles sur les milieux ConA contrairement aux larves sur milieux Ap2 qui sont toutes parfaitement fixées.

69 En l'absence de choix, les taux de fixation des larves sur les milieux saccharose et sur les milieux Ap2 sont identiques pendant les 24 premières heures après leur dépôt. Ce type de milieux très simple est par exemple utilisé par les virologistes végétaux lors de leurs tests d'acquisition virale.

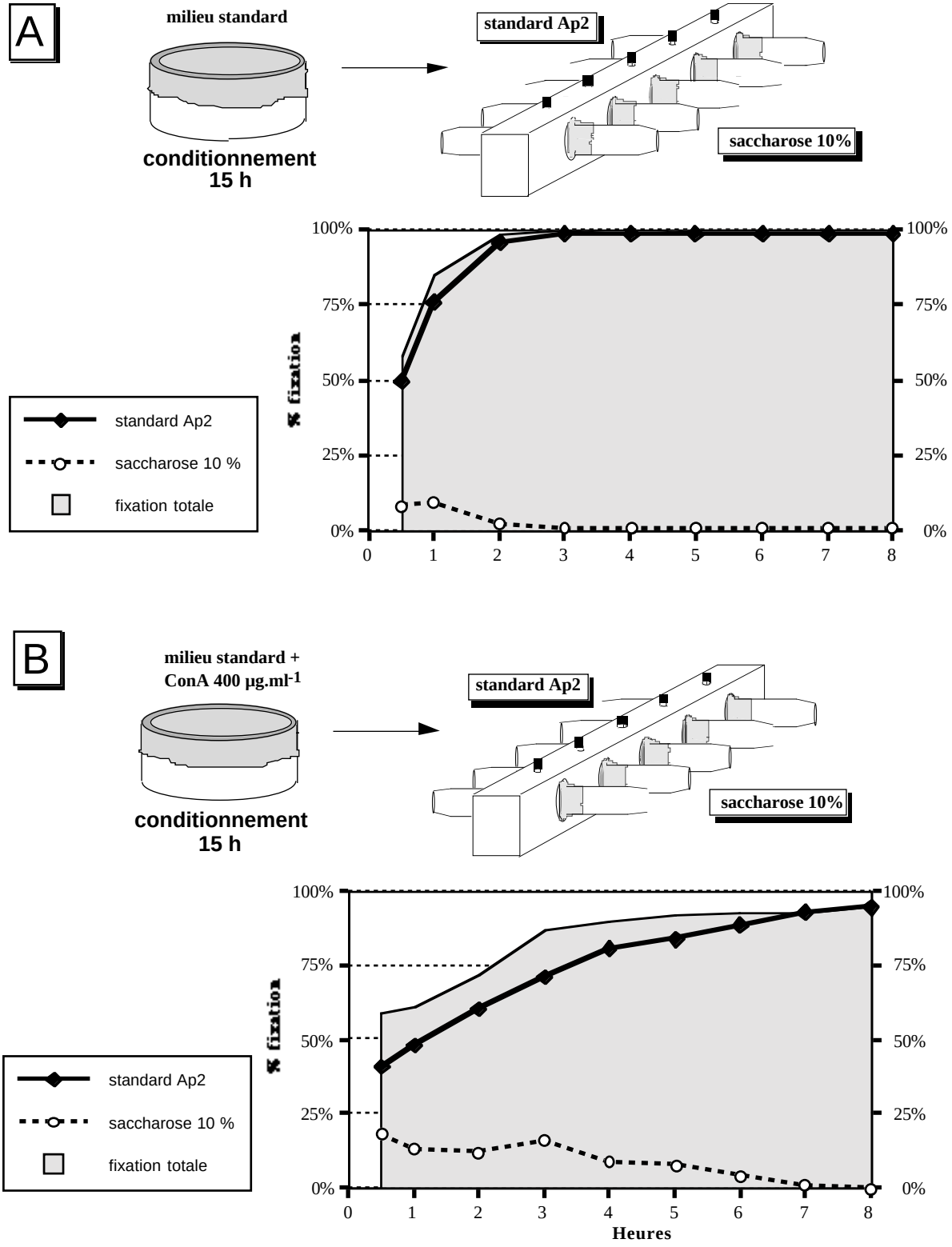


Figure 30 - Comportement de larves de l'espèce *A. pisum* mises en condition de choix entre du milieu standard Ap2 et une solution de saccharose à 10 %. Les larves sont conditionnées au préalable 15 heures sur :
A. milieu Ap2,
B. milieu Ap2 + 400 µg.ml-1 de Concanavaline A.

La figure 30A montre logiquement que le milieu Ap2 est préféré à la solution de saccharose : Ap2 est riche en acides aminés, qui sont aussi des phagostimulants. Il est intéressant de constater que les larves font leur choix très rapidement (en moins de 30minutes). Comme dans les tests précédents il faut attendre environ deux heures pour voir toutes les larves fixées. Sur la figure 30B, il apparaît que les larves préalablement intoxiquées se fixent toujours préférentiellement sur les milieux Ap2. Elles semblent donc incapables, ou tout au moins faiblement capables, d'associer le contexte gustatif et la toxicité : 10 à 15 % d'entre elles se fixent sur les milieux saccharose dans les quatre premières heures. Il pourrait s'agir de larves reconnaissant effectivement le milieu Ap2 et qui, le considérant comme toxique, se fixeraient préférentiellement sur le milieu saccharose ; mais un pourcentage important de larves ne sont pas fixées pendant ces quatre premières heures (conséquence de l'intoxication). Il est donc possible que les larves sur milieux saccharose correspondent à des insectes perturbés s'y fixant provisoirement, et non des larves refusant le mileu Ap2. La lecture du tableau des résultats bruts (données non montrées) révèle d'ailleurs que les 10 à 15 % de larves fixées sur milieux saccharose pendant les quatre premières heures correspondent à des larves différentes d'un relevé à l'autre, contrairement au nombre de larves fixées sur les milieux Ap2 qui est toujours constant ou croissant pour chaque répétition : les larves se fixent sur les milieux Ap2 et s'y maintiennent.

Nous conclurons donc que les **larves d'*A. pisum*,** dans le contexte expérimental présenté, possèdent de **faibles capacités d'association** entre l'**intoxication** par la **ConA** et la **reconnaissance sensorielle.**

3.2. Mesure des volumes de milieux ingérés par des pucerons intoxiqués par la Concanavaline A - Cinétique de l'intoxication.

3.2.1 - Mesure des volumes de milieux ingérés par des larves intoxiquées

L'objectif de cette expérience était de déterminer si l'intoxication des pucerons par la Concanavaline A se traduisait bien par une diminution des quantités de milieux ingérées. Un marqueur radioactif, l'inuline ^{14}C est incorporé dans des milieux standards simples (témoins) contenant 200 µg.ml^{-1} de ConA. Des larves âgées de 24 à 26 h sont laissées sur ces milieux pendant 2 à 16 h. La radioactivité des larves et de leurs miellats permet d'estimer les quantités de milieux ingérées pendant ces durées. Dans un premier temps la concentration de 200 µg.ml^{-1} a été choisie parce que nous pensions qu'elle était suffisamment forte pour induire un effet significatif (au moins au bout de 16 h), mais qu'elle n'était cependant pas trop forte pour perturber les larves au point de les empêcher de se fixer.

Le tableau 13 et la figure 31 montrent qu'effectivement les effets de cette concentration moyenne de lectine se manifeste par une **diminution des volumes de milieux ingérés par des larves saines au bout de 16 h d'intoxication.**

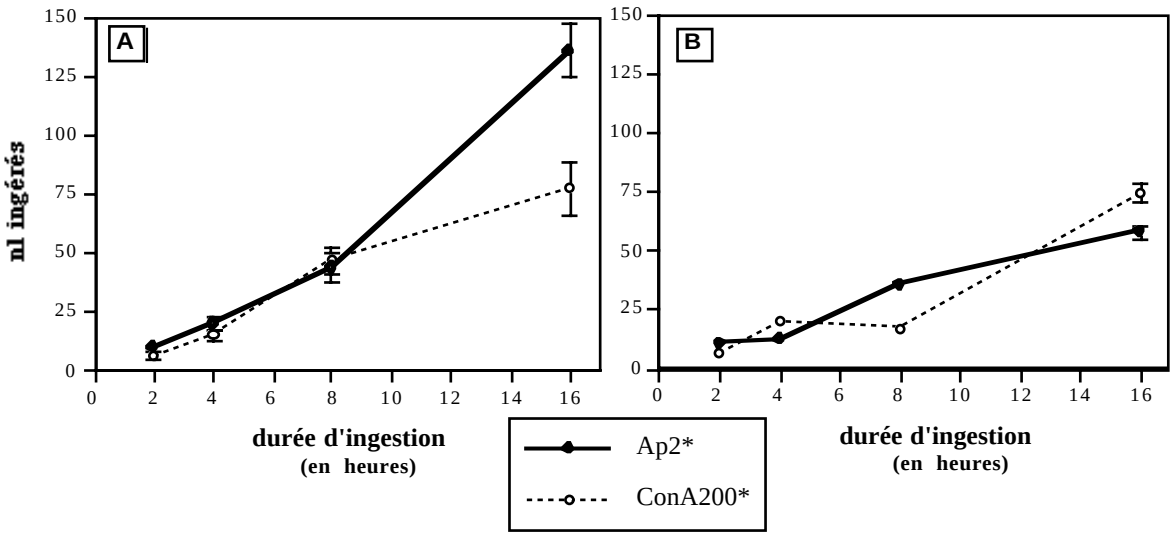


Figure 31 - Quantités de milieu Ap2 marqué (^{14}C inuline = *) avec ou sans ConA (200 µg.ml $^{-1}$) ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* pendant des durées comprises entre 2h et 16h (les valeurs moyennes sont rapportées avec leur erreur standard).

A. Larves préalablement conditionnées 22h sur milieux Ap2,
B. Larves préalablement conditionnées 22h sur milieux Ap2 + ConA 400 µg.ml $^{-1}$.

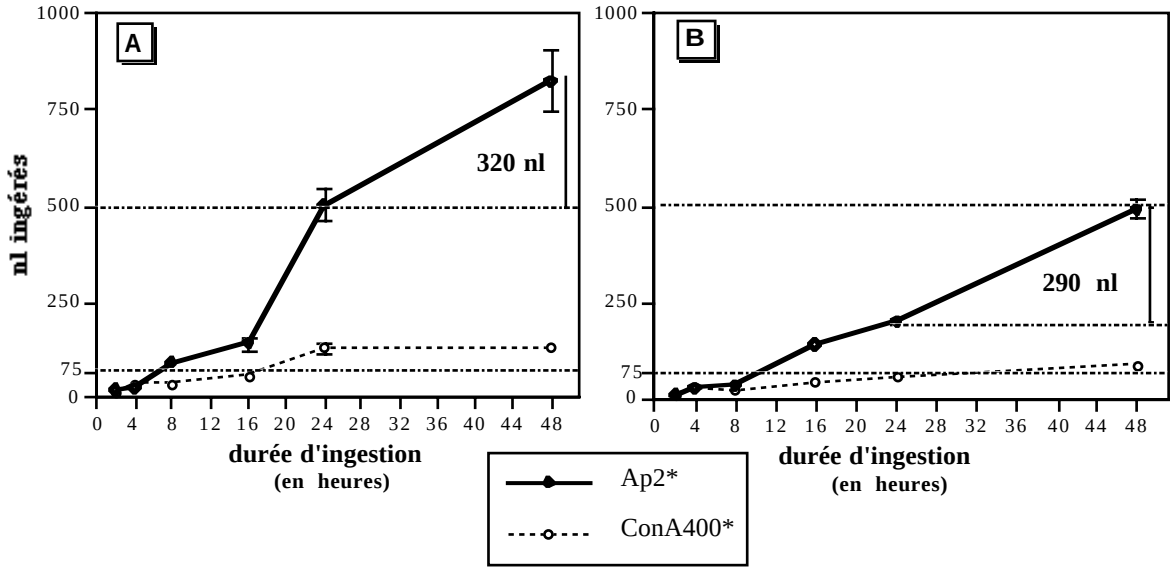


Figure 32 - Quantités de milieu marqué (^{14}C inuline = *) avec ou sans ConA (400 µg.ml $^{-1}$) ingérées par des larves de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* pendant des durées comprises entre 2h et 48h (les valeurs moyennes sont rapportées avec leur erreur standard).

A. Larves préalablement conditionnées 22h sur milieux Ap2,
B. Larves préalablement conditionnées 22h sur milieux Ap2 + ConA 400 µg.ml $^{-1}$.

		Modalités			
		Ap2 → Ap2*	Ap2 → $ConA_{200}$*	$ConA_{400}$ → Ap2 *	$ConA_{400}$ → $ConA_{200}$*
Durée d'ingestion	*2h*	10 (1)	6 (2)	11 (2)	6 (3)
	4h	20 (3)	15 (2)	12 (5)	20 (5)
	8h	44 (6) **a**	47 (6) **a**	35 (2) **ab**	17 (3) **b**
	16 h	136 (11) **a**	77 (11) **b**	58 (10) **b**	74 (7) **b**

Tableau 13 - Quantités de milieu Ap2 marqué avec ou sans ConA (200 µg.ml^{-1}) ingérées par des larves de l'espèce Acyrthosiphon pisum *préalablement intoxiquées ou non (ConA à 400 µg.ml^{-1}) pendant des durées de 2h à 16 h.*

Les quantités moyennes ingérées sont exprimées en nanolitres. L'erreur standard (SE) est donnée entre parenthèses. Sur une même ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes diffèrent significativement au seuil de 5 % (test Kruskal-Wallis, procédure de Conover). * milieu marqué en ^{14}C inuline.

Nous observons au moment du relevé de la seizième heure que toutes les larves sont normalement fixées sur les milieux. L'intoxication se traduirait donc bien par une diminution des volumes ingérés, et non par un arrêt de la prise alimentaire. Cette observation est discutée ultérieurement dans le paragraphe consacré à l'EPG sur milieux artificiels.

Des larves de deux autres lots sont fortement intoxiquées (ConA400 µg.ml^{-1}) avant d'être transférées sur milieux standards ou ConA 200 marqués.

Dans le tableau 13, les valeurs correspondantes aux durées d'ingestion de deux et quatre heures sont données à titre indicatif. En réalité trois à quatre larves uniquement sont fixées et sont prises en compte dans le calcul du volume moyen de milieu ingéré, alors que dans le test précédent la majorité des larves sont fixées dès la deuxième heure. Nous retiendrons simplement que les larves préalablement intoxiquées ont plus de mal à se fixer rapidement sur les milieux marqués. Au relevé de 8 h, le pourcentage de larves fixées sur milieux standards est de 80 %, contre 60 % sur milieux ConA (non significatif, $p > 5$ %). Au relevé de 16 h, toutes les larves de chaque modalité sont fixées. Ce second test confirme que les **pucerons ne semblent pas reconnaître la lectine à cette dose :** même très intoxiqués ils continuent d'ingérer du milieu ConA (200 µg.ml^{-1}) à un taux analogue à celui du milieu témoin ($p = 67$ %). Les effets de la forte intoxication initiale se manifestent donc encore au moins pendant 16 h (au relevé de 16 h, les larves intoxiquées du second test ingèrent deux fois moins de milieu standard que les larves normales du premier test, figures 31A & B).

Le tableau 14 (moitié gauche) et la figure 32 complètent ces résultats. En intoxicant des larves avec des milieux ConA (400 µg.ml^{-1}) marqués, nous pouvons observer la **cinétique de l'intoxication** à cette concentration un peu plus élevée (figure 32A). Toutes les larves se fixent rapidement sur les milieux standards ou ConA. Dès la huitième heure, l'intoxication se traduit par une diminution significative des volumes de milieux ConA ingérés ($p < 0,01$ %). Après 24 h d'intoxication les larves semblent s'arrêter de s'alimenter (les quantités ingérées en 24 h et en 48 h sont du même ordre de grandeur). Mais nous relevons qu'elles restent parfaitement fixées pendant l'intervalle de temps 24-48 h. Il s'avère qu'une mue intervient précisément dans cet intervalle de temps. Nous préférons donc conclure que l'intoxication à 400 µg.ml^{-1} se traduit par un **taux d'ingestion très faible (mais pas nul) dès la vingt-quatrième heure**.

		Modalités			
		Ap2 → Ap2*	Ap2 → $ConA_{400}$*	$ConA_{400}$ → Ap2*	$ConA_{400}$ → $ConA_{400}$*
Durée d'ingestion	*2h*	18 (2) [0]	15 (2) [1]	11 (4) [2]	9 (2) [1]
	4h	26 (8) [1]	35 (5) [1]	27 (4) [1]	25 (3) [1]
	8h	92 (7) [0] **a**	35 (5) [1] **b**	34 (6) [2] **b**	20 (3) [1] **b**
	16h	140 (18) [7] **a**	60 (7) [7] **b**	136 (11) [8] **a**	45 (5) [4] **b**
	24h	501 (41) [6] **a**	129 (13) [6] **bc**	201 (18) [10] **b**	53 (4) [10] **c**
	48 h	824 (82) [15] **a**	130 (11) [14] **c**	491 (52) [16] **b**	88 (10) [10] **c**

Tableau 14 - Quantités de milieu Ap2 marqué avec ou sans ConA (400 µg.ml^{-1}) ingérées par des larves de l'espèce Acyrthosiphon pisum *préalablement intoxiquées ou non (ConA à 400 µg.ml^{-1}) pendant des durées de 2h à 48h.*

Les quantités moyennes ingérées sont exprimées en nanolitres. L'erreur standard (SE) est donnée entre parenthèses. Sur une même ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes diffèrent * milieu marqué en ^{14}C Inuline.

Les résultats exprimés sur la figure 32B et le tableau 14 (moitié droite) sont plus tranchés que ceux de la figure 31. Dès la seizième heure, les pucerons préalablement intoxiqués puis transférés sur milieux standards commencent à être significativement moins affectés que les pucerons intoxiqués continuellement. **Vingt-quatre heures après avoir subi cette intoxication, les larves transférées sur milieu Ap2 s'alimentent normalement** : en effet dans l'intervalle de temps 24-48 h elles ingèrent autant que des larves non intoxiquées (290 nl *vs* 320 nl ; figure 32A & B). Le nombre de mues est un autre indice qui permet de rendre compte des effets de l'intoxication (nombre indiqué entre crochets dans le tableau 14). Dans le cas présent, les larves préalablement intoxiquées puis transférées sur milieu Ap2, muent normalement : au relevé de 48 h en particulier, toutes les larves ont mué une fois et 60 % d'entre elles ont mué deux fois (*vs* 50 % pour des larves non intoxiquées). Le taux d'ingestion (exprimé en nl par heure) des larves intoxiquées par de la ConA à 400 µg.ml^{-1} est d'environ 3 nl.h^{-1} après 16 heures d'intoxication (tableau 14, 2ème colonne). Ce taux est sensiblement décroissant après 40 h (24 + 16 h) d'intoxication (2,8 nl.h^{-1} à 40 h ; 2,20 nl.h^{-1} à 48 h ; 1,8 nl.h^{-1} à 72 h). Les effets toxiques de la lectine après 2 ou 3 jours de contact se traduisent aussi par un retard au niveau des mues : 10 % des larves laissées 24 h sur milieux ConA marqués ont mué (contre 60 à 100 % pour les autres modalités), aucune n'a fait deux mues en 48 h (tableau 14, 4ème colonne).

3.2.2. Mesures des volumes de milieux ingérés par des adultes intoxiqués

Pour des raisons pratiques, l'expérience précédente n'a pas été reconduite sur des adultes (nous ne disposions pas de quantités suffisantes d'inuline marquée). Néanmoins nous avons pu mesurer les quantités de milieux ingérées en 48 h par des adultes moyennement, à très fortement, intoxiqués.

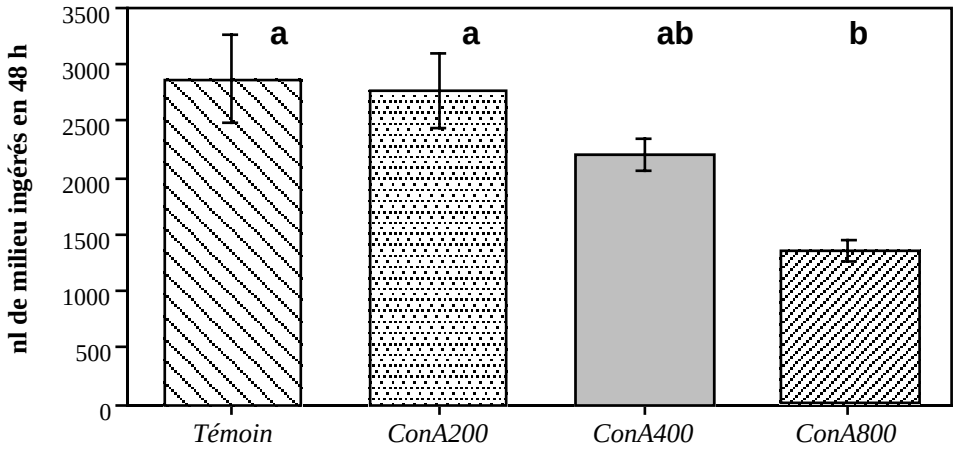


Figure 33 - Quantités de milieu ingérées en 48 h par des pucerons adultes de l'espèce Acyrthosiphon pisum fixés sur des milieux standards Ap2 contenant 200, 400 ou 800 µg.ml^{-1} de Concanavaline A.

Valeurs moyennes (±SE) de 10 pucerons comparées par une ANOVA (les moyennes indiquées avec des lettres identiques ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%).

La ConA à la concentration de 200 µg.ml^{-1} n'induit pas de baisse significative des quantités ingérées par les adultes. A cette même concentration, les larves sont affectées dès la seizième heure d'intoxication (figure 31A). Nous remarquons aussi les effets moindres de la lectine à 400 µg.ml^{-1} sur les adultes par rapport aux larves : en 48 h, sur les premiers, les effets sont sensibles mais non significatifs ($p > 5$ %) alors que les larves sont affectées dès la huitième heure (figure 32A). **Seule la concentration de 800 µg.ml^{-1} induit une baisse significative des quantités de milieu ingérées** ($p < 1$ %). Nous observons néanmoins que cette modification ne s'accompagne **pas** d'une **perturbation majeure du comportement de fixation** : 80 % des adultes sur milieux ConA 800 sont toujours fixés à l'issue des 48 h, contre 90 %, 90 % et 60 % sur milieux témoins, ConA 200 et ConA 400 respectivement.

3.3. Étude du comportement d'alimentation d'A. pisum intoxiqué sur des milieux contenant de la Concanavaline A par la technique EPG

3.3.1. Réponses attendues justifiant la mise en oeuvre de cette technique

Nous avons souligné dans le paragraphe Matériels & Méthodes l'intérêt de la technique d'électropénétrographie dans l'étude des interactions plante/insecte phloémophage. Dans le cadre de notre étude, l'EPG nous est apparue comme une technique particulièrement adéquate pour caractériser dans le temps et en continu les effets de l'intoxication par la ConA sur le comportement d'alimentation des pucerons adultes. Les tests de choix nous apportent un premier élément de réponse quant à la cinétique de l'intoxication, l'EPG vient donc en complément de ces résultats. L'utilisation d'un marqueur radioactif a permis de mettre en évidence une diminution des volumes ingérés par les pucerons intoxiqués au cours du temps. Notre but était de confirmer (ou non) que cette diminution était liée à une inhibition indirecte de l'ingestion et non pas à une aversion gustative. Celle-ci supposerait en effet que les pucerons soient capables de détecter (au sens gustatif) la lectine (hypothèse réfutée par les premiers tests) et se traduirait à plus ou moins court terme par un refus des milieux toxiques de la part des pucerons. Nous observerions alors une réponse de type "tout ou rien".

3.3.2. Les types d'ondes observables : np, C et G

A notre connaissance, aucune publication n'a jamais fait état de l'application de l'EPG sur des pucerons placés sur milieux artificiels. Nous avons eu l'occasion, au cours d'une semaine de travail dans le laboratoire de F. Tjallingii (Université de Wageningen, Pays-bas), de faire

quelques essais préliminaires. Mais nous ne disposions d'aucune donnée complète relative aux types d'ondes observables sur milieux, et sur leur corrélation avec une activité de pénétration des stylets. Notre premier travail a consisté à caractériser ces ondes en les comparant à celles parfaitement définies du modèle de Tjallingii.

Nous nous attendions éventuellement à un cas de figure très simple avec des ondes traduisant l'absence d'activité alimentaire des pucerons et des ondes corrélées à la pénétration des stylets dans le milieu (non pénétration/pénétration). Or, nous pouvons distinguer nettement deux types d'ondes lorsque les stylets sont enfoncés. Nous les appellerons ondes C et ondes G par analogie avec celles observables sur plantes[70] (figure 34) :

Ondes - Désignation		C	G
Fréquence (en Hz)	Plantes	composite et très variable	4 à 8
	Milieux artificiels	composite et très variable	5 à 7

Nous considérons donc que les **ondes C** sont corrélées à des **activités diverses** de salivation (nous retrouvons par exemple les ondes caractéristiques de type B définies par Tjallingii, annexe 6) et de pénétration des stylets, et selon notre interprétation les **ondes G** sont liées à une activité d'**ingestion active** de milieu. Dans tous les enregistrements, des ondes caractéristiques apparaissent en début de phase G. Elles sont notées par un point d'interrogation sur la figure 34. Si nous ne pouvons expliquer la signification de ces ondes (séquence comportementale brève d'initiation de l'ingestion active ?), elles sont cependant très importantes à considérer car elles marquent distinctement la transition entre une phase C et une phase G. Or, tout notre raisonnement pour interpréter les résultats obtenus sur milieux lectines repose précisément sur cette distinction phase C/phase G.

[70] Par souci de simplification des termes nous regroupons les ondes de type A, B et C sous le terme ondes C, la distinction de ces trois phases ne se justifiant pas pour notre analyse.

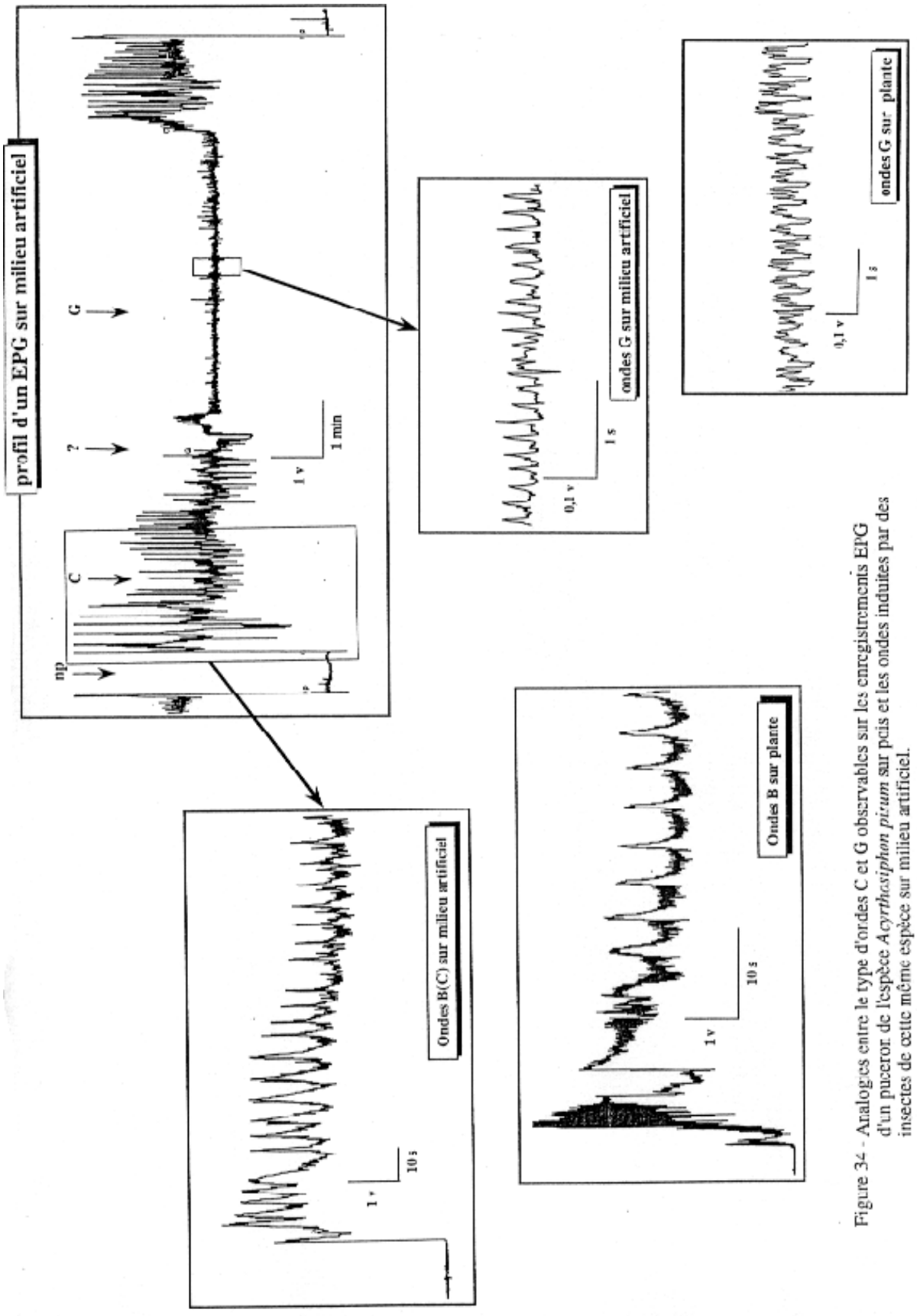


Figure 34 - Analogies entre le type d'ordes C et G observables sur les enregistrements EPG d'un puceron de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur pois et les ondes induites par des insectes de cette même espèce sur milieu artificiel.

Un autre type d'onde apparaît sur certains enregistrements mais n'est pas pris en considération dans l'analyse statistique. Ces ondes présentent de nombreuses caractéristiques du type pd (pour "potentiel drop", chute de potentiel) défini par Tjallingii :

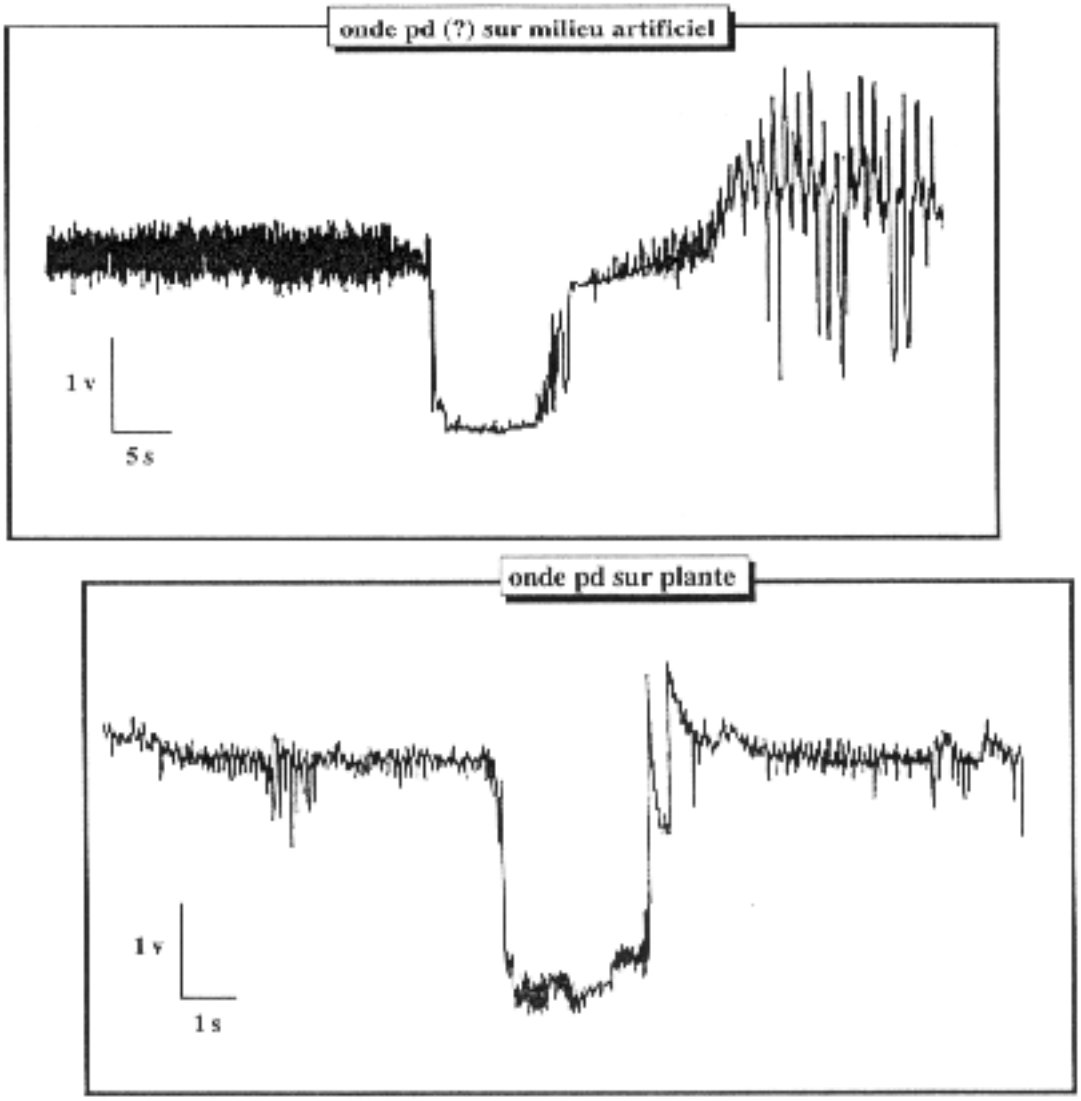


Figure 35 - Analogie entre le type d'ondes pd observable sur les enregistrements EPG d'un puceron sur plante et des ondes induites par un puceron sur milieu artificiel. Les ondes pd sont corrélées à une activité de pénétration des stylets dans une cellule.

Sur plantes, ces ondes sont corrélées à une pénétration des stylets dans une cellule vivante. La chute de potentiel observée s'expliquerait par la différence de potentiel entre l'extérieur de la cellule et son cytoplasme. Ce n'est bien sûr pas le cas en milieu artificiel, où l'on observe qu'une composante résistive du signal (alors qu'elle est essentiellement électromotrice dans les "pd" de plantes), et ses caractéristiques temporelles y sont également très différentes (ni même durée, ni même structure en sous-phases, figure 35). On peut néanmoins raisonnablement supposer qu'il s'agit de traces du même acte comportemental (tentative de ponction intracellulaire), mais son aspect anecdotique en milieu artificiel nous conduit à négliger cette séquence.

3.3.3. Analyse statistique

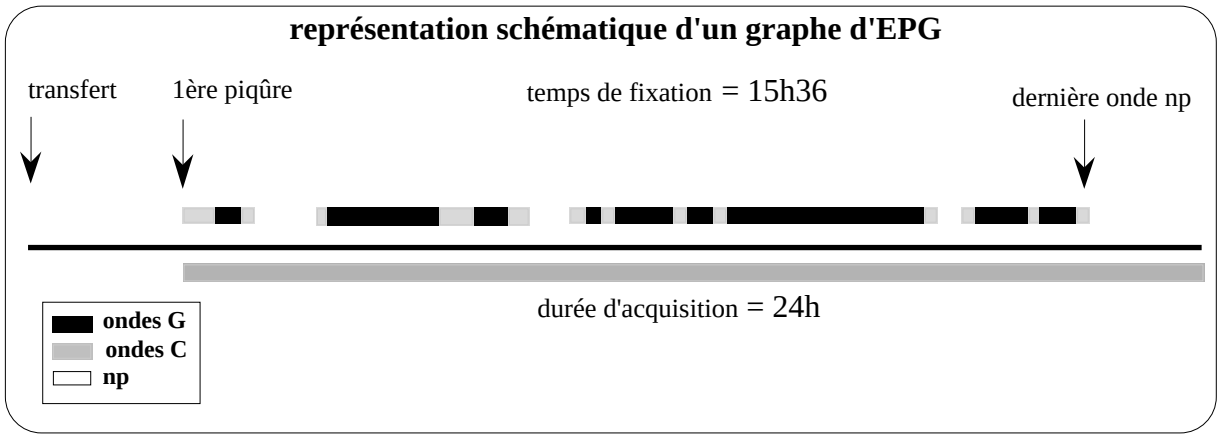
3.3.3.1. Choix des variables ou paramètres à analyser

A la suite de l'analyse statistique préliminaire effectuée à partir du logiciel MacStylet™, nous avons choisi des paramètres qui permettent, soit de qualifier (nombre des différentes phases), soit de quantifier (durée des phases) la pénétration des stylets pour chaque enregistrement. Sur la base des modèles de Caillaud (1994) et de Tjallingii (1990) nous avons analysé dans un premier temps vingt-huit variables. Mais le caractère non discriminant et/ou non informatif de dix-sept d'entre elles, nous a fait les supprimer de l'analyse. Les onze variables retenues sont rapportées :

N°	Variables	Signification biologique
1	Nb(np)	nombre de phases de non-pénétration des stylets
2	Nb(C)	nombre de phases C
3	Nb(G)	nombre de phases G
4	D(np)[1]	durée cumulée en phase np pendant le temps de fixation
5	D(C)	durée cumulée en phase C pendant le temps de fixation
6	D(G)	durée cumulée en phase G pendant le temps de fixation
7	$D(G)_{np}$	durée cumulée moyenne en phase G entre deux phases np
8	%G	durée passée en phase G rapportée au temps d'enregistrement (4h, 8h ou 24h)
9	%C	durée passée en phase C rapportée au temps d'enregistrement (4h, 8h ou 24h)
10	%np	durée passée en phase np rapportée au temps d'enregistrement (4h, 8h ou 24h)
11	d(G)	durée moyenne d'une phase G

[1] la durée en phase np entre le début de l'acquisition et la première onde C n'est pas prise en compte (figure ci-dessous).
[2] entre deux phases np, plusieurs phases G peuvent être observées(figure ci-dessous).

Tableau 15 - Variables retenues pour l'analyse statistique des enregistrements EPG obtenus avec des pucerons de l'espèce Acyrthosiphon pisum *sur milieux standards simples ou contenant de la Concanavaline A.*



3.3.3.2. Analyses univariée et multivariée

Seules les variables 6, 7, 8 et 11 permettent de distinguer les deux lots de pucerons après les heures d'intoxication avec de la ConA à 400 µg.ml^{-1}. Ces variables se rapportent toutes à l'**onde de type G** (figure 36).

Le tableau 16 indique plus précisément que les pucerons restent en phase d'ingestion, sur les 4 premières heures, pendant 1 h 37 min (variable 6) sur milieux ConA contre 2 h 19 min pour les pucerons sur milieux standards. Les individus de chaque lot piquent aussi souvent dans leur milieu respectif (≈ 20 piqûres, variable 2, p = 49 %) et montrent autant de phases d'ingestion (≈ 3 phases ; variable 3, p = 22 %). Cependant, entre deux phases de non-pénétration, les pucerons non-intoxiqués ingèrent plus longtemps en moyenne, bien que les durées soient variables (variable 7, p = 4,3 %).

Les enregistrements sur 8 h indiquent un comportement des pucerons sensiblement analogue, mais les données sur 24 h montrent que sur ce laps de temps, les différences entre les milieux avec ou sans ConA s'estompent progressivement. En moyenne les individus sur milieux standards restent fixés 2 heures de plus (15 *vs* 13 h), mais cette différence n'est pas significative (p = 53 %).

Sur une période de 24 h, **l'intoxication** se traduit par une **diminution** sensible des durées passées en phase d'**ingestion** (variable 8, p = 10,4 %) et une **augmentation** de la durée des **phases C** (pénétration des stylets sans ingestion ; variable 9, p = 6,1 %), indiquant un phénomène net d'**habituation à la présence de la ConA**.

Paradoxalement, nous observons que les pucerons plus fortement intoxiqués de la deuxième série de tests (600 µ.ml^{-1}) semblent être moins vite affectés que les individus de la série précédente. Nous avons cependant constaté une différence très sensible du comportement des pucerons de chacune des séries dans les premières heures d'enregistrement. Il semblerait que les adultes de la première série se soient fixés plus difficilement.

La comparaison des valeurs moyennes des variables 1 et 2 de chaque lot de pucerons témoins permet de rendre compte de cette différence (tableau 16) : au cours des 8 premières heures d'enregistrement les pucerons témoins de la première série de mesures sont sortis deux fois plus souvent que ceux de la deuxième série (variable 1). Une part de la variabilité entre les pucerons intoxiqués et les non-intoxiqués des premiers enregistrements pourrait donc s'expliquer par le fait que les pucerons sont "perturbés" au moment où nous les transférons. Ils ont d'autant plus de mal à se fixer sur leur milieu que celui-ci contient la lectine. Ceci constitue éventuellement un autre exemple d'interaction toxicité/milieu, dont nous avions parlé dans le chapitre précédent.

Sur milieux contenant la **ConA à 600 µg.ml^{-1}**, les **effets** ne se manifestent qu'**au-delà de 8 h d'intoxication** (figure 37). Pendant le temps qu'ils restent fixés, les pucerons intoxiqués sortent plus longtemps leurs stylets que les pucerons normaux (variable 4, p = 9,6 %) mais pas plus souvent (variable 1, p = 29 %) ; ils restent plus longtemps en phase C (variable 5, p = 6 %) ; ils ingèrent plus souvent du milieu (variable 3, p = 6,7 %) mais pas plus longtemps (variable 6, p = 84 %), et en moyenne leur **phase d'ingestion** est **moins longue** (variable 7, p = 0,42 %). Ce comportement traduit parfaitement une **perturbation** des pucerons (ils s'arrêtent provisoirement d'ingérer) **indirectement liée à l'intoxication**. Mais celle-ci ne se manifeste pas par une aversion gustative : les pucerons ne détectent pas la lectine et bien qu'affectés, ils persistent à ingérer du milieu toxique.

Si l'analyse univariée traduit sans ambiguïté un comportement différent des pucerons intoxiqués, nous constatons cependant une **grande variabilité** du profil des enregistrements au sein d'un même lot d'insectes (intoxiqués ou non). Cette variabilité transparaît sur les figures des annexes 9A à F, représentant les histogrammes des valeurs de chaque variable rangées par modalité. Les courbes de Gauss des figures 36 et 37 rendent compte également de cette variabilité pour certaines variables.

Le calcul des rapports de corrélations modalité/variable, c'est à dire le pourcentage de la variance d'une variable expliquée par la partition témoin-lectine, nous indique qu'environ

N° variables Nom variables		n	1 Nb(np)	2 Nb(C)	3 Nb(G)	4 D(np)	5 D(C)	6 D(G)	7 D(G)np	8 %G	9 %C	10 %np	11 d(G)
4 h	**Témoin**	16	17,6 (3,4)	19,9 (3,7)	2,8 (0,5)	28 (6)	69 (14)	139 (18)	100 (24)	58,5 (7,6)	29,4 (5,9)	12,1 (2,6)	97 (24)
	ConA400	22	20,6 (3,1)	23,5 (3,3)	3,6 (0,4)	36 (5)	86 (11)	97 (15)	45 (14)	42,0 (6,1)	40,9 (4,6)	17,1 (2,1)	45 (14)
	P %		*52,1*	*48,6*	*21,8*	*33,9*	*32,8*	***8,1***	***4,3***	***9,6***	*12,7*	*13,9*	***5,3***
8 h	**Témoin**	16	25,0 (4,7)	28,5 (5,2)	4,3 (0,7)	46 (9)	102 (19)	284 (36)	113 (27)	62,3 (6,5)	25,7 (4,6)	12,0 (2,9)	89 (18)
	ConA400	22	29,4 (4,2)	33,2 (4,6)	4,9 (0,6)	50 (7)	128 (17)	205 (31)	54 (12)	47,7 (5,8)	37,8 (4,4)	14,5 (1,7)	53 (12)
	P %		*49,7*	*50*	*52,7*	*73,9*	*38,4*	***10,5***	***3,9***	***10,5***	***7,1***	*44,6*	***9,5***
24 h	**Témoin**	16	45,6 (7,1)	50,8 (8,0)	7,5 (1,1)	84 (12)	195 (26)	624 (103)	107 (23)	61,4 (5,7)	26,2 (4,0)	12,3 (2,8)	97 (22)
	ConA400	22	45,6 (5,6)	50,5 (6,2)	6,9 (1,0)	89 (15)	234 (37)	456 (81)	85 (26)	48,8 (5,0)	37,1 (3,8)	14,2 (1,6)	81 (26)
	P %		*99,7*	*97,5*	*67,6*	*80,9*	*43,3*	*20,1*	*54,5*	***10,4***	***6,1***	*55,3*	*65,1*
4 h	**Témoin**	27	8,3 (1,7)	9,7 (2,0)	2,7 (0,5)	24 (7)	32 (8)	184 (13)	131 (17)	19,9 (1,9)	6,0 (2,5)	74,1 (3,4)	130 (17)
	ConA600	28	6,4 (1,3)	8,1 (1,7)	2,5 (0,5)	25 (7)	34 (8)	180 (12)	147 (18)	17,8 (1,9)	3,5 (0,7)	78,7 (1,9)	143 (18)
	P %		*35,4*	*53,2*	*78,5*	*97,9*	*83*	*81,8*	*53,5*	*43,7*	*31,8*	*23,1*	*60,2*
8 h	**Témoin**	27	14,2 (3,1)	16,7 (3,7)	4,1 (1,0)	32 (7)	56 (15)	374 (26)	208 (30)	38,2 (2,9)	9,5 (3,2)	52,4 (3,6)	192 (30)
	ConA600	28	13,8 (2,3)	16,6 (2,8)	3,9 (0,6)	45 (8)	67 (12)	360 (17)	181 (28)	34,5 (2,4)	7,5 (1,8)	58,1 (2,8)	173 (29)
	P %		*90,9*	*98,9*	*92,4*	*24,6*	*55,5*	*65,4*	*51,7*	*32,4*	*57,6*	*21,2*	*63,8*
24 h	**Témoin**	27	34,9 (5,6)	40,4 (6,5)	8,0 (1,4)	89 (13)	154 (30)	798 (83)	256 (51)	71,4 (4,5)	18,6 (3,7)	10,1 (1,6)	188 (34)
	ConA600	28	42,3 (4,0)	51,0 (4,6)	11,3 (1,1)	124 (16)	222 (19)	778 (55)	102 (10)	67,7 (2,6)	20,7 (2,2)	11,6 (1,3)	81 (8)
	P %		*28,8*	*18,5*	***6,7***	***9,6***	***6***	*84,25*	***5,7***	*47,8*	*61,3*	*46,8*	***0,3***

Tableau 16 - Valeurs moyennes de chacune des 11 variables retenues pour l'analyse statistique des enregistrements EPG obtenus avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur milieux standards simples ou contenant de la Concanavaline A.

Les pucerons ont été testés sur des milieux ConA à 400 ou 600 µg.ml^{-1} au cours de deux expériences indépendantes. Les valeurs sont calculées (± SE) pour des durées d'acquisition de 4h, 8h et 24h. La probabilité d'égalité des moyennes est donnée (test Mann-Whitney, StatView 4®). Les temps sont exprimés en minutes (var 4, 5, 6, 7 & 11).

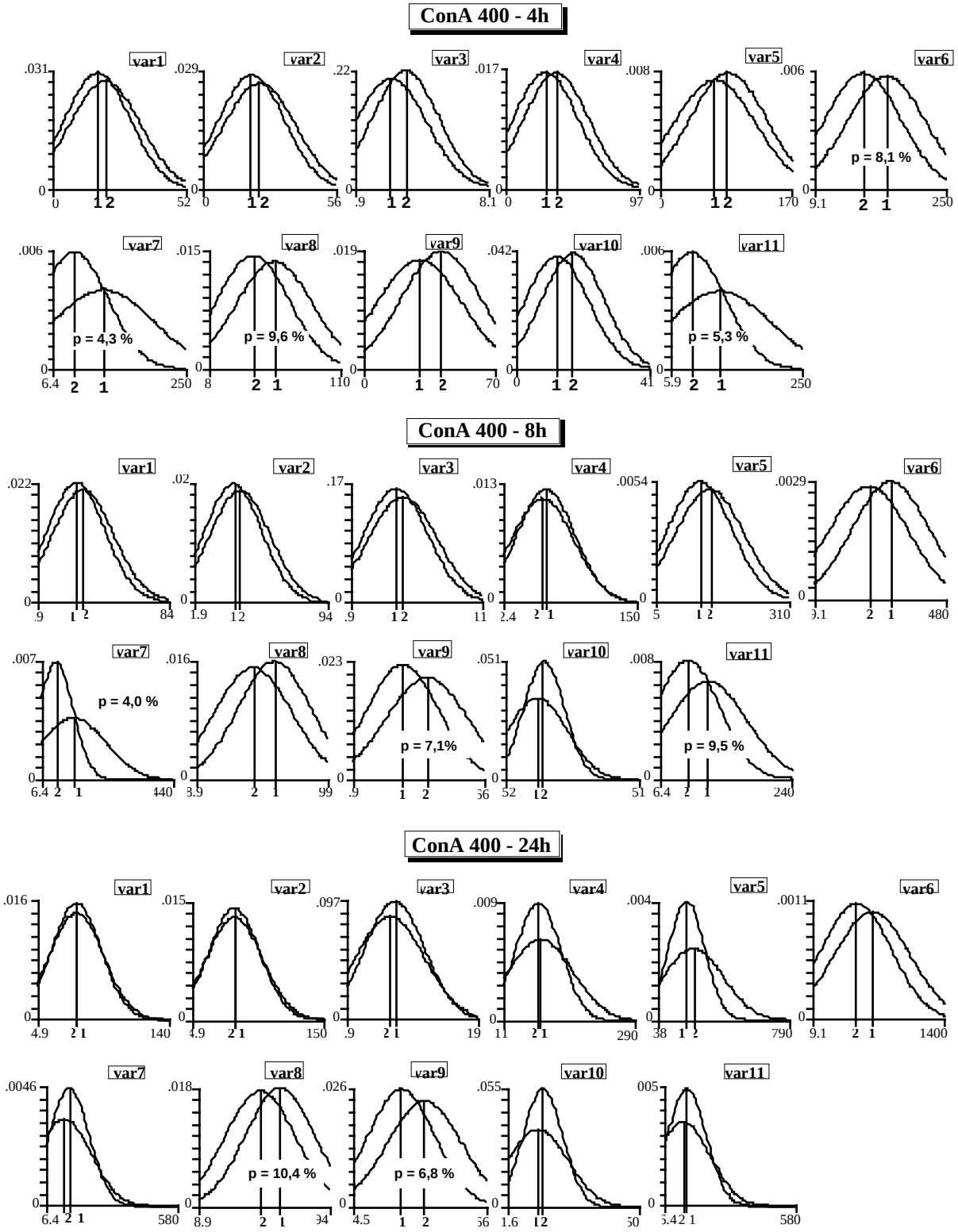


Figure 36 - Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur des milieux standards simples ou contenant 400 µg.ml-1 de Concanavaline A. Superposition des courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA 400) pour trois durées d'acquisition (4h, 8h & 24h) et position des moyennes (1 & 2) pour les 11 variables retenues dans l'analyse.

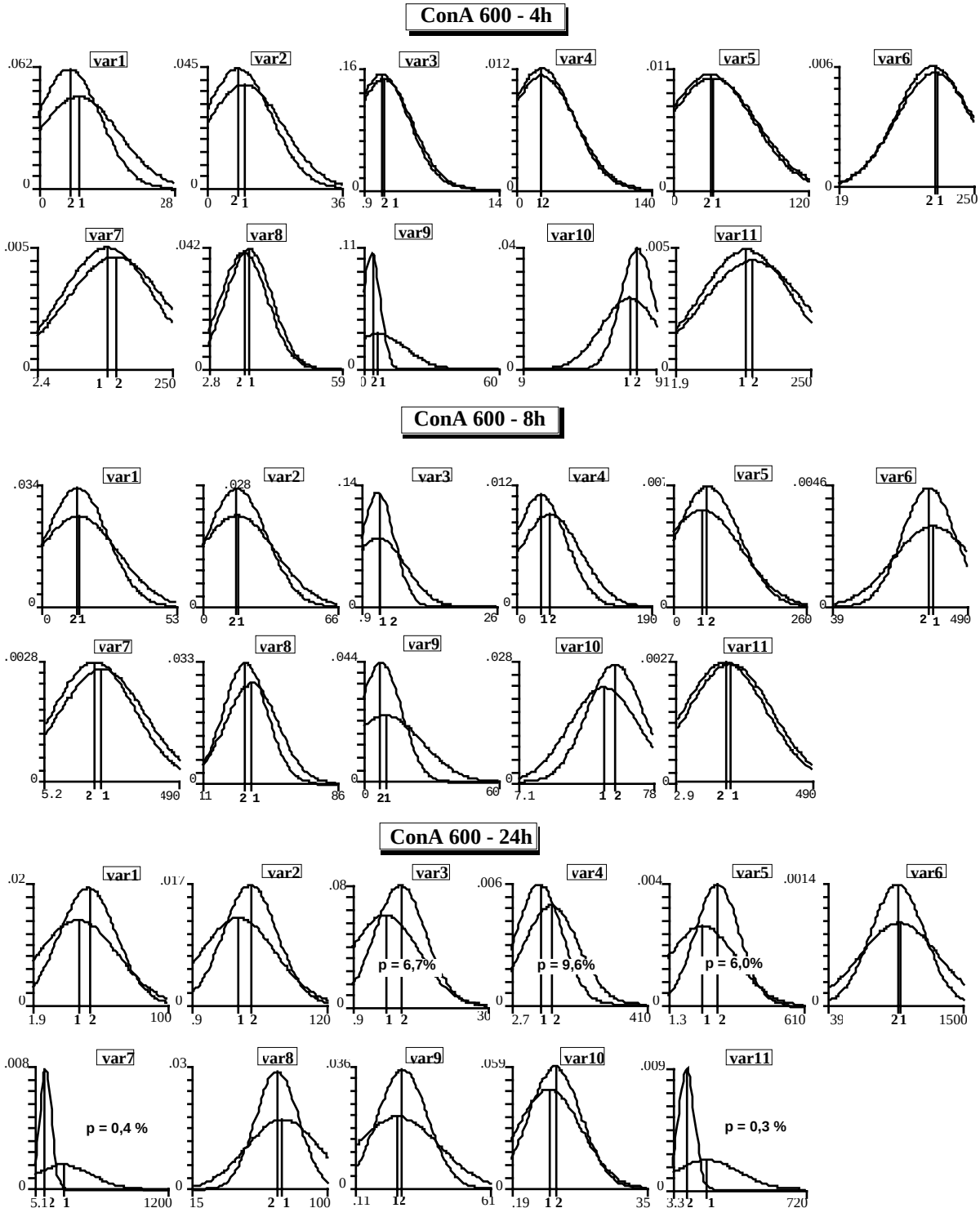


Figure 37 - Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur des milieux standards simples ou contenant 600 µg.ml^{-1} de Concanavaline A. Superposition des courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA600) pour trois durées d'acquisition (4h, 8h & 24h) et position des moyennes (1 & 2) pour les 11 variables retenues dans l'analyse.

10 à 15 % de la variabilité des données est de type inter-modalité. *A contrario*, 85 à 90 % de la variabilité est donc liée à l'hétérogénéité intra-individuelle des pucerons de chaque modalité, ce qui est assez typique des analyses comportementales de type EPG, qui nécessitent donc un nombre souvent élevé de répétitions.

La figure 38 résume l'ensemble de ces informations. Elle correspond au dépouillement graphique de l'analyse en composantes principales normée (ACPn) exécutée sur le tableau 55 x 5 des données correspondant aux enregistrements de 24 h de la deuxième série de mesures (avec la ConA à 600 $\mu g.ml^{-1}$) :

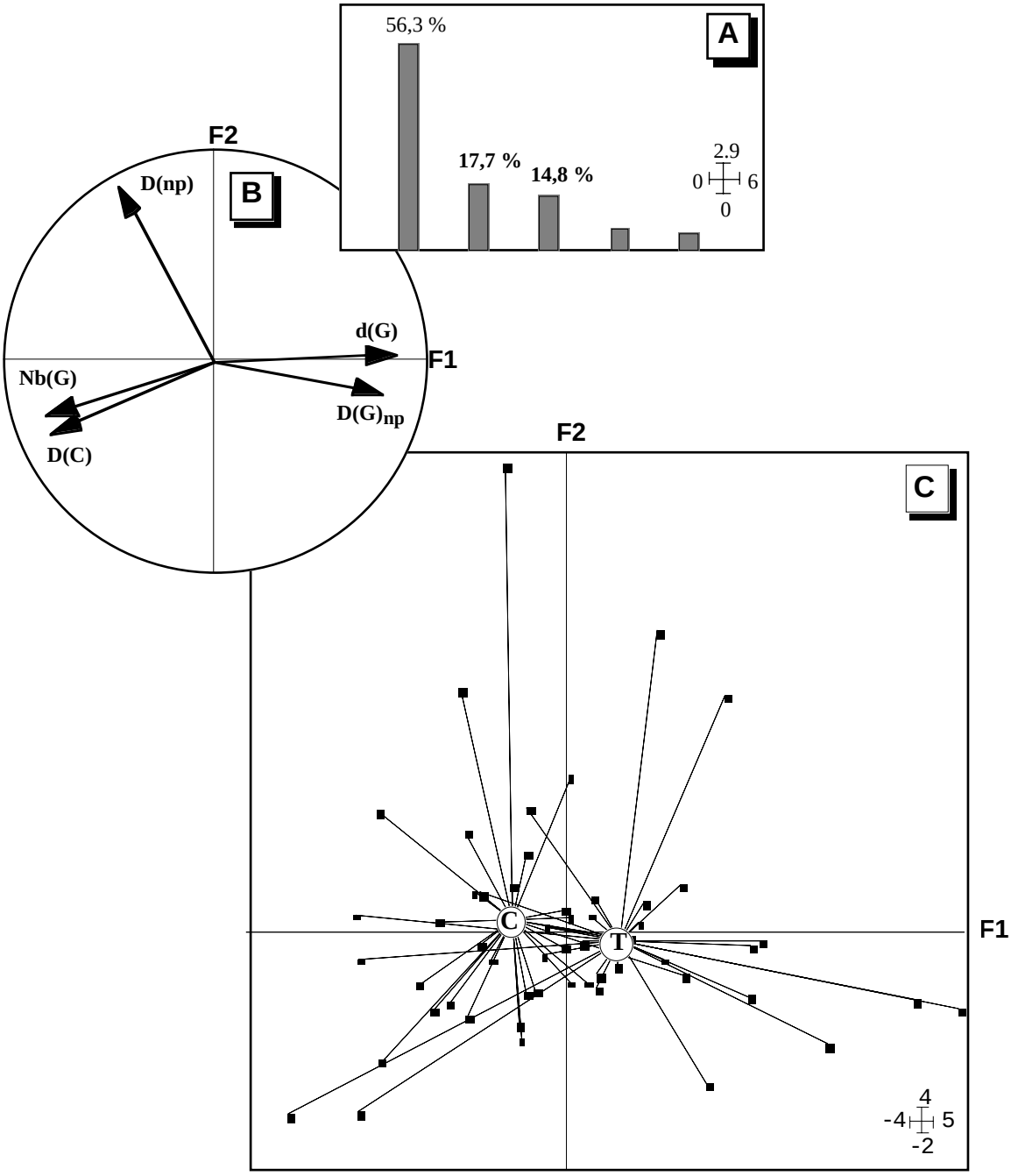


Figure 38 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs de l'ACP normée exécutée sur le tableau des données relatives aux enregistrements EPG de 24 h réalisés avec des pucerons de l'espèce *Acyrthosiphon pisum* sur des milieux standards simples ou contenant 600 µg.ml $^{-1}$ de Concanavaline A.

A - Diagramme des valeurs propres ;
B - Cercle des corrélations variables-facteurs
C - Plan factoriel F1-F2 : représentation des centres de gravité par modalité (**T** : témoins ;
C : ConA 600) et liaisons modalités-pucerons.

Seules les cinq variables permettant de discriminer significativement les pucerons de chaque modalité sont retenues pour l'analyse[71] (var 3, 4, 5, 7 & 11). La représentation en étoile de la figure 38C illustre très clairement la variabilité inter-modalité.

4. Discussion

La première étape de notre travail pour préciser les mécanismes d'action mis en jeu dans l'interaction puceron/lectine a concerné l'étude des effets induits par les lectines sur le comportement d'alimentation des pucerons.

Des études antérieures effectuées sur milieux artificiels par nos collègues britanniques de Durham (Powell *et al.*, 1995b) révèlent que la GNA (0,1% (m/v) soit 1 mg.ml^{-1}) agit à moyen terme (24 h) sur la cicadelle, *Nilaparvata lugens*. Ses effets se manifestent par une diminution des quantités de miellat excrétées, corrélée vraisemblablement à une diminution des quantités de milieu ingérées. Mais cette étude n'apporte qu'une réponse très incomplète du mode d'action de la lectine sur la cicadelle.

L'étude présentée dans ce chapitre visait à caractériser beaucoup plus précisément les effets de l'intoxication de la ConA sur le comportement alimentaire des pucerons, avant d'entreprendre des études plus fines sur le mode d'action cellulaire.

Les **tests comportementaux** sur les animaux de laboratoire (souris, rats, cobayes) sont bien connus et maîtrisés. Ces tests ont précisément été mis en oeuvre pour étudier le comportement alimentaire du rat sur un aliment contenant de la Concanavaline A. Celle-ci est refusée par les animaux, mais ce comportement n'est pas dû à une réponse de néophobie, ni à une aversion gustative conditionnée (Larue-Achagiotis *et al.*, 1992).

Si l'objectif de cette étude est identique au nôtre, la problématique est sensiblement différente. Il n'existe en effet à notre connaissance aucun test comportemental décrit pour les pucerons.

Après de nombreuses mises au point, nous avons élaboré des protocoles permettant d'analyser, par des tests simples, le comportement des pucerons en présence de la Concanavaline A.

Les **tests de choix**, montrent que la **lectine n'est pas phagorépulsive** mais induit très rapidement un effet toxique qui agit en retour sur les niveaux et les comportements d'ingestion. Les pucerons se sont avérés incapables de détecter la ConA, y compris à des doses létales.

Les mesures de l'**ingestion** par un **traceur radioactif** nous confirment cette interprétation et permettent de préciser la **cinétique de l'intoxication**. A la concentration moyenne de 200 µg.ml^{-1} les effets de la ConA se manifestent sur les larves après 12 à 16 heures d'intoxication. Lorsque la concentration est doublée, nous observons dès la huitième heure une diminution significative des taux d'inuline ingérée. Des larves fortement intoxiquées pendant 22 heures sur de la ConA à 400 µg.ml^{-1} puis transférées sur milieux standards sans ConA semblent ne plus subir les effets de l'intoxication au bout de 24 h : entre 24 et 48 h, les larves préalablement intoxiquées ou non, ingèrent les mêmes quantités de milieu (environ 300 nl). Nous donnons une interprétation de cette observation dans le chapitre 4.

La mise en oeuvre de la technique d'**électropénétrographie sur milieux artificiels** s'est avérée délicate, mais l'analyse des enregistrements obtenus permet de discriminer les pucerons intoxiqués et les pucerons normaux, même si les **profils** des enregistrements sont **très variables** quelle que soit la modalité. Cette variabilité s'explique assez facilement par les conditions expérimentales. Certains pucerons sont vraisemblablement très gênés par le fil d'or encollé sur leur abdomen. De plus, l'étroitesse de la cage dans laquelle ils sont transférés pour les mesures ne leur permet pas réellement de se déplacer (annexe 8). A quelques exceptions

[71] Les six autres variables sont également supprimées dans la mesure où elles n'apportent aucune information supplémentaire.

près aucun puceron câblé n'est resté fixé plus de 20 heures au cours de nos différentes acquisitions, alors qu'en conditions normales sur milieux artificiels un puceron reste fixé beaucoup plus longtemps[72]. L'électropénétrographie sur milieux artificiels présente donc un inconvénient majeur limitant son application à des études sur des durées assez courtes (16 à 20 h au plus) et avec un grand nombre de répétitions (minimum 20 par modalité).

L'analyse statistique nous amène à la conclusion que les **pucerons semblent s'habituer à la lectine** (au sens comportemental du terme) à la concentration de 400 µg.ml^{-1}. Ces résultats peuvent sembler contradictoires en comparaison de ceux obtenus précédemment avec les larves placées sur des milieux contenant un traceur radioactif, mais l'EPG et la mesure de l'ingestion ne fournissent cependant pas le même type d'information. De plus, pour des questions techniques et méthodologiques, l'EPG est conduite sur des jeunes adultes. L'apparente contradiction des résultats s'expliquerait simplement par une moindre sensibilité des adultes aux effets toxiques de la ConA. Les résultats des tests d'intoxication sublétale (chapitre 2) et d'ingestion de milieu contenant de l'inuline marquée et de très fortes concentrations de lectine corroborent cette observation. C'est ce qui explique aussi qu'avec la ConA à 600 µg.ml^{-1}, les adultes (qui se sont mieux fixés que les pucerons de la 1ère série avec la ConA à 400 µg.ml^{-1}) ne semblent pas affectés dans les premières heures d'intoxication. Seuls les enregistrements sur 24 h traduisent dans ce cas une diminution de la prise alimentaire. L'EPG confirme que cette diminution est la conséquence d'une **inhibition indirecte de l'ingestion** : les pucerons ne refusent pas les milieux toxiques.

Ce mode d'action de la ConA nous laissent supposer que, par extrapolation, les lectines à mannose/glucose pourraient assurer une bonne protection contre les pucerons et leur virus associés :

- des **plantes transgéniques** exprimant dans leur sève phloémienne une lectine, même à moyenne concentration (100 - 200 µg.ml^{-1}), pourraient **limiter la croissance** des **colonies de pucerons** les envahissant ;

- une protection contre les attaques de virus pourrait être effective tant à l'échelle de la plante, qu'à l'échelle d'une culture. Nous discuterons dans la conclusion finale de cette thèse des possibilités d'interaction compétitive lectine-virus circulants (même type de récepteur au niveau de l'épithélium intestinal ?). Le fait que la lectine ne soit pas phagorépulsive pourrait conférer à la culture entière une **protection** accrue contre le risque de **propagation des maladies virales** : les pucerons ne détectant pas la toxine, resteront au niveau de la plante qu'ils auront choisi, et l'expansion de la colonie sur les plantes voisines sera limitée.

Nous avons fait état dans le chapitre 1 du problème d'apparition de résistance aux transgènes. Un tel danger n'est pas à écarter avec les lectines mais un **contournement comportemental** de la toxicité induite par ces molécules paraît **très peu probable** compte tenu précisément de leur mode d'action sur le comportement des pucerons.

---

[72] Au cours des tests d'intoxication à long terme par exemple, les adultes restent fixés sur quelques millimètres carrés de feuille de Parafilm pendant toute la durée de l'expérience (20 à 25 jours).

Chapitre 4.

Mode d'action des lectines sur les pucerons

1. Introduction

Après avoir montré comment la ConA affecte les performances biologiques d'*A. pisum* et son comportement alimentaire, l'étape suivante de notre étude consiste à démontrer son lieu d'action : quelle est sa cible physiologique et comment agit-elle sur cette cible ?

Notre hypothèse de travail est qu'elle se lie au niveau de l'épithélium intestinal et qu'elle induit une perturbation du fonctionnement du tube digestif.

Du fait de la toxicité de certaines lectines vis à vis des mammifères (chapitre 1), de nombreuses études toxicologiques sont conduites sur des animaux de laboratoire et en particulier le rat (Pusztai, 1991). Lorenzsonn et Olsen (1982) ont démontré par exemple que la ConA affecte de manière irréversible l'épithélium intestinal du rat et perturbe sa digestion. La lectine provoque la rupture, puis la désintégration de la bordure striée de la surface apicale des cellules épithéliales, entraînant une altération du cytosquelette suivie d'une lyse cellulaire.

Les effets induits par la ConA sont inhibés lorsque des mannosides (notamment mannane et mannose) sont administrés par injection ou incorporés dans la nourriture simultanément avec la lectine (Pusztai, 1991 ; Larue-Achagiotis *et al.*, 1992). Ces résultats démontrent que la toxicité est corrélée à la propriété des lectines de se lier spécifiquement aux sucres.

L'administration d'un anticorps anti-sucrase-isomaltase, une enzyme spécifique des glycoprotéines membranaires, induit des effets similaires à ceux de la ConA (Lorenzsonn et Olsen, 1982), ce qui amène les auteurs de cette étude à suggérer que les effets de la lectine résulteraient d'une interaction lectine-récepteur et non d'un processus purement intracellulaire. Les observations de Larue-Achagiolis *et al.* (1992) corroborent cette hypothèse : la lectine en interagissant avec certains groupements glycosylés de la paroi intestinale du rat, réduit la prise alimentaire en empêchant l'absorption intestinale.

D'autres travaux suggèrent que la lectine agirait sur la perméabilité membranaire des cellules épithéliales (Sjölander *et al.*, 1984). L'hypothèse d'une interaction des lectines avec les groupements glycosylés de la paroi intestinale du rat est aujourd'hui bien admise et Schumacher *et al.* (1993) utilisent par exemple classiquement des lectines pour identifier par immunohistochimie la nature des sucres à la surface du petit intestin.

Pusztai *et al.* (1979b) démontrent que les lésions induites par la lectine du haricot (PHA) au niveau de la bordure en brosse des entérocytes du duodénum du rat sont réversibles, au moins en début d'intoxication, si l'ingestion de la lectine cesse. Au contraire, si les animaux continuent de consommer la lectine, ces lésions deviennent irréversibles. Une proportion non négligeable de la PHA (5 % et plus de la quantité intubée dans l'estomac) traverse l'épithélium intestinal et peut être décelée par des méthodes immuno-cytochimiques dans les lysosomes et les vacuoles de la région du corps de Golgi des entérocytes (Lorenzsonn et Olsen, 1982). Luly et Emmelot (1975) quant à eux démontrent que la ConA inhibe *in vitro* la (Na^+-K^+)-ATPase des membranes des hépatocytes de rat.

Enfin, il est important de noter que la lectine est très résistante à la protéolyse intestinale. Nakata et Kimura (1990, 1991) retrouvent ainsi plus de 90 % de la ConA intacte dans les fèces de rat.

La multiplicité de ces observations (résumées dans les annexes 3A & 3B) démontre que le mode d'action des lectines au niveau cellulaire est encore imparfaitement compris. Nous ne disposons d'aucune information sur ce mode d'action chez les insectes. Gatehouse *et al.* (1984) avancent néanmoins une hypothèse reprenant les observations faites sur le rat pour expliquer la toxicité de la PHA vis-à-vis de la bruche, *Callosobruchus maculatus*. Les études toxicologiques effectuées sur des mammifères constituent donc nos seules références pour tenter de comprendre le mode d'action de la ConA sur *A. pisum*.

Notre objectif est de déterminer dans un premier temps à quel niveau la ConA agirait dans le tube digestif, puis de décrire les lésions qu'elle induit et les perturbations physiologiques qui découlent de l'intoxication. Des techniques diverses sont utilisées. Les interrogations précises auxquelles nous avons voulu répondre et l'ensemble de notre démarche sont résumés par une localisation schématique de nos expériences présentées :

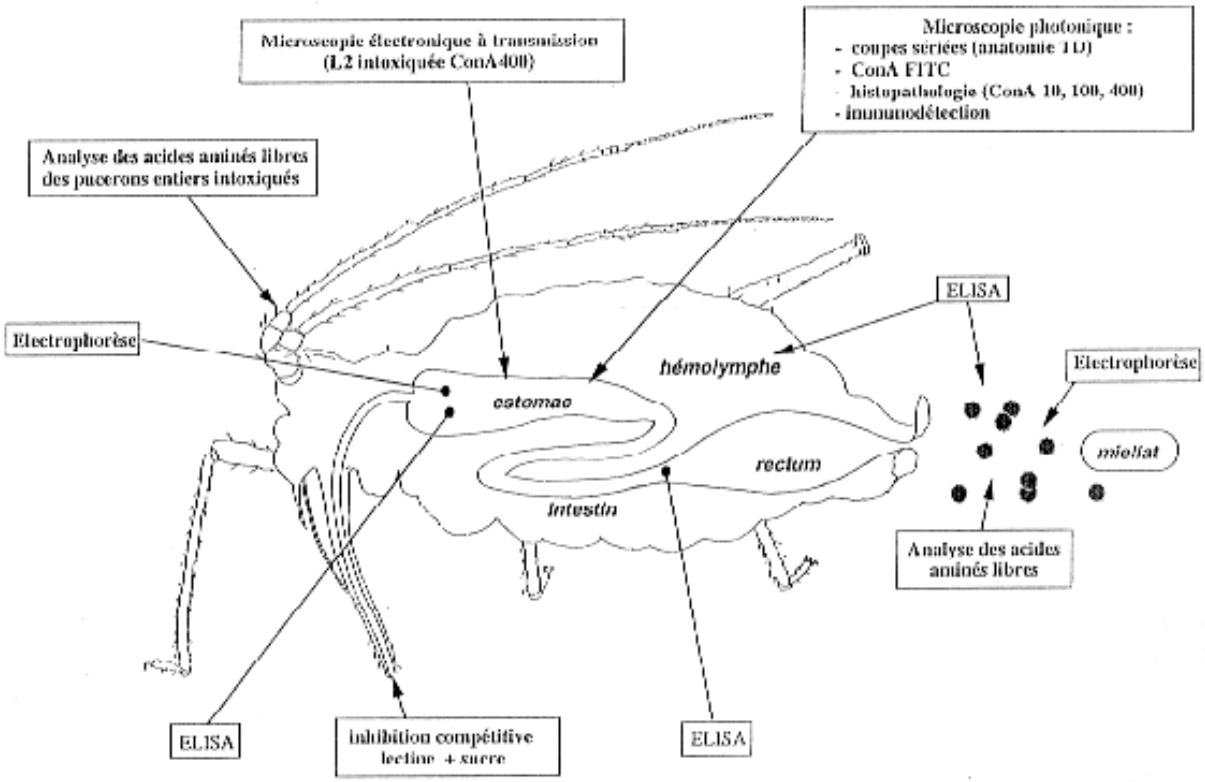


Figure 39 - Descriptif de la démarche et des techniques utilisées pour l'étude du mode d'action cellulaire de la Concanavaline A sur le puceron Acyrthosiphon pisum.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

2.1.1. Principe

Les protéines sont solubilisées dans une solution contenant 2 % de SDS. Ce détergent provoque la formation de micelles négatives autour des protéines. Ainsi, sous l'influence d'un champ électrique, il est possible de faire migrer et de séparer des protéines dans un gel d'acrylamide. Nous avons utilisé des gels à 15 % d'acrylamide permettant une séparation optimale de protéines ayant des PM compris entre 20 et 100 kDa.

2.1.2. Préparation des extraits de miellat

Des jeunes adultes (5 x 20) sont laissés pendant 72 h sur des milieux standards Ap2 simples ou contenant 100 µg.ml^{-1} de ConA, ou 100 µg.ml^{-1} de peroxydase, ou 100 µg.ml^{-1} de ConA et 100 µg.ml^{-1} de peroxydase. Une étude antérieure réalisée au laboratoire montre que la peroxydase est rejetée en quantité importante dans le miellat sans être dégradée et en n'étant pas ou très peu fixée dans le tube digestif (résultat non publié). Cette protéine est donc utilisée ici comme témoin de transit neutre. La récolte et la déshydratation des miellats s'effectuent à l'issue des trois jours (fiche-protocole N° 16). Les extraits secs sont repris dans 20 µl de tampon d'introduction (1,5 % dithiotréitol, 2 % SDS, Tris HCl 0,12M, 0,0075 % Bleu de Bromophénol).

2.1.3. Préparation des extraits de tube digestif

Quatre lots de vingt jeunes adultes sont intoxiqués pendant 48 h avec de la ConA à 200, 400 ou 800 µg.ml^{-1}. Les tubes digestifs sont prélevés par dissection dans de l'eau distillée (fiche-protocole N° 8) et aussitôt plongés dans 20 µl de tampon d'introduction. Les vingt tubes digestifs sont broyés au potter.

2.1.4. Dépôt des échantillons et électrophorèse [73]

Les dépôts sont réalisés après homogénéisation des extraits dans le tampon d'introduction. L'ensemble est chauffé pendant 3 minutes à 100°C (dénaturation des protéines et chargement en SDS) puis centrifugé 3 minutes à 7000 g pour éliminer les particules insolubles.

Le gel est ensuite monté dans un appareil à électrophorèse (Mini protean I, Bio Rad) et la cuve est remplie de tampon de migration. Un kit de marqueurs de poids moléculaire est utilisé (3 à 5 µg par dépôt). L'électrophorèse est conduite à tension constante (200 V) et à température ambiante pendant 50 min environ, jusqu'à l'arrivée en bas du gel du front de migration, visualisé par le bleu de bromophénol.

Les gels sont placés de 20 minutes à 1 nuit dans le colorant à 37°C sous agitation. La décoloration se fait dans 3 bains (10 min, 10 min et 30 min) de solution de décoloration I. Puis les gels sont conservés une nuit au minimum dans la solution II, avant d'être séchés sur un papier bristol, 1 h 30 à 60°C, à l'aide d'un sécheur de gel LKB.

73 Les compositions de toutes les solutions sont données dans la fiche-protocole N° 17.

2.2. Dosage de la Concanavaline A par technique ELISA

2.2.1. Principe et méthodologie

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est basée sur l'utilisation d'une enzyme comme marqueur d'anticorps ou d'antigènes. Elle permet de doser avec une bonne sensibilité des constituants d'intérêt biologique. Cette technique regroupe en fait un ensemble de méthodes immunoenzymatiques. Nous décrivons ici uniquement celle que nous avons utilisée pour doser la ConA.

Nous avons appliqué un dosage non compétitif dit de type "sandwich" (fiche-protocole N° 9A) : c'est le procédé qui donne les résultats les plus satisfaisants aussi bien du point de vue de la sensibilité que de la reproductibilité. Selon cette méthode, la ConA est captée dans un premier temps par un anticorps spécifique immobilisé sur un support (anticorps primaire). Dans un deuxième temps, après sa réaction avec un anticorps biotinylé de même spécificité (anticorps secondaire) la quantité d'antigène couplé est mesurée en utilisant le procédé BRAB (fiche-protocole N° 9A). L'activité enzymatique obtenue est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée par l'anticorps primaire.

La procédure est détaillée dans la fiche-protocole N° 9B. Comme pour toute méthode immunoenzymatique, le dosage de la ConA est optimisé en trouvant pour chaque étape le meilleur temps d'incubation et la meilleure concentration de l'anticorps primaire (5 $\mu g.ml^{-1}$), du conjugué (1 $\mu g.ml^{-1}$), de l'avidine (0,1 $\mu g.ml^{-1}$) et de la peroxydase biotinylée (0,1 $\mu g.ml^{-1}$). Dans nos conditions, la méthode permet de doser la ConA dans une gamme de 1 à 30 ng déposés par puits (10 à 300 $ng.ml^{-1}$ d'extrait, annexe 10).

Au-delà de 100 ng/puits, nous observons un bruit de fond proportionnel à la quantité de lectine (signal en l'absence d'anticorps secondaire). Celui-ci s'expliquerait par la formation d'un complexe avidine-lectine due à la présence de résidus mannose à la surface des molécules d'avidine auxquels se lient la ConA (Pierce, manuel d'instructions). Dans la gamme de linéarité 1-30 ng/puits, la précision (mesurée) est de l'ordre de 5 à 6 %, nous la considérons comme bonne.

Pour le dosage de chaque extrait, 2 à 3 échantillons indépendants sont analysés. Une gamme étalon de ConA réalisée pour chaque dosage permet une extrapolation des doses trouvées dans les échantillons.

2.2.2. Préparation des extraits de miellats, d'hémolymphe, d'estomac et d'intestin

Des jeunes adultes (3 x 25) sont transférés sur des milieux standards Ap2 contenant 0, 200, 400 ou 800 $\mu g.ml^{-1}$ de ConA. Les miellats sont récoltés toutes les 24 h pendant 3 jours. La fiche protocole N° 18 décrit en détail la préparation des différents échantillons. Celle-ci étant relativement longue, elle s'effectue la veille du dosage. Les tubes digestifs sont prélevés par dissection (fiche-procotole N° 8) dans une solution de Yeager (liquide physiologique, fiche-protocole N° 19). Trois estomacs et trois intestins sont isolés et plongés dans 20 µl de Yeager puis broyés au potter. Les échantillons sont stockés une nuit à +4°C. Nous rajoutons 80 µl de tampon PBS-Tween-gélatine à chaque extrait juste avant le dépôt dans les puits de la plaque ELISA.

Pour prélever de l'hémolymphe, les pucerons sont fixés vivants sur une lame grâce à un adhésif double face, leurs pattes postérieures sont coupées (microciseaux), la goutte exsudant de l'incision est prélevée avec l'embout d'une seringue Hamilton et dissoute dans 20 µl d'une solution de Yeager saturée en PTU[74]. Cinq à six gouttes sur dix pucerons sont ainsi récoltées par échantillon. Juste avant le dosage, 80 µl de tampon PBS-tween-gélatine sont rajoutés aux extraits.

[74] Phényl-thio urée, inhibiteur de la mélanisation

2.3. Microscopie photonique

2.3.1. Coupes sériées de larves du quatrième stade larvaire

L'anatomie du tube digestif de l'espèce *A. pisum* est reconstituée à partir de coupes sériées de larves de stade 4. A ce stade le tube digestif est bien formé, les larves sont plus faciles à fixer et le développement des embryons ne perturbe pas encore la disposition du tube digestif.

Des larves qui se sont développées sur milieu standard Ap2 sont plongées dans un fixateur liquide de Duboscq-Brazil. Après une fixation d'une durée minimale de 24 heures, les pucerons sont préparés par double inclusion (gélose-paraffine) puis coupés au microtome (historange LKB) en coupes fines de 6 à 8 µm d'épaisseur. Celles-ci sont colorées après déparaffinage au bleu de Toluidine et par un mélange Rouge Ponceau - Bleu de Heidenham. La fiche protocole N° 20 donne plus de détail sur les différentes étapes de ce protocole. Les coupes sont observées sous un microscope (réf. Dialux 20, Leitz Inc., Wetzlar, Allemagne) en immersion et photographiées.

2.3.2. Histofluorescence

Des larves néonates sont placées sur des milieux standards Ap2 contenant de la ConA-FITC[75] à la concentration de 102 µg.ml^{-1} (0,1 µM). Elles sont laissées 48 h sur ces milieux, puis sont fixées dans du tampon phosphate monopotassique-disodique (67 mM, pH = 7,2), contenant 3 % de paraformaldéhyde, pendant 24 heures à +4°C. Les larves sont préparées par double inclusion (gélose-gélatine) puis coupées en coupes fines de 6 à 8 µm (étapes 1 et 2 de la fiche-protocole N° 20). Après déparaffinage, celles-ci sont observées sous un microscope à fluorescence (Laborlux S, Leitz Inc., Wetzlar, Allemagne) avec un filtre FITC, en immersion et photographiées.

2.3.3. Histopathologie

Des larves néonates sont laissées 48 heures sur des milieux standards contenant 0, 10, 100 ou 400 µg.ml^{-1} de ConA. Elles sont fixées, préparées, et les coupes sont effectuées et observées selon la méthodologie décrite au paragraphe 2.3.1.

2.3.4. Immunomarquage

Des larves de stade 3 sont intoxiquées 48 heures sur des milieux standards contenant 200, 400 ou 800 µg.ml^{-1} de ConA. Elles sont fixées dans une solution de Bouin alcoolique pendant 24 h avant d'être incluses dans de la paraffine et coupées à 5 µm d'épaisseur (étapes 1 et 2 de la fiche-protocole N° 20). Les coupes sont alors montées sur des lames recouvertes de poly-L-lysine agissant comme colle. Elles sont déparaffinées et hydratées par des bains successifs de xylène, éthanol et eau.

L'immunomarquage est réalisé grâce au kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Inc., USA). Les coupes sont d'abord incubées dans du méthanol contenant 2 % d'H_2O_2 afin d'éliminer les peroxidases endogènes. Elles sont ensuite rincées dans du tampon TBS[76]. Puis elles sont incubées dans la solution TBS contenant 2 % de sérum normal de chèvre (TBS-SNC) afin de masquer les éventuels sites non-spécifiques. Elles sont mises en présence de l'anticorps anti-ConA[77] dilué à 1 µg.ml^{-1} dans du TBS-SNC (ou pour les témoins de

---

[75] la ConA et la FITC (fluorescein isothiocyanate) sont complexées à raison de 1 mole de ConA pour 3,6 moles de FITC. Réf. Sigma#C-7642

[76] Tampon phosphate salin, réf. SIGMA p-4417, voir fiche protocole N° 9A

[77] Anticorps de lapin (fraction. IgG primaires) anti-ConA, réf. SIGMA C-7401, voir fiche protocole n° 9A

spécificité, notés pour non-spécifiques (NS), en présence de sérum de lapin préimmun dilué au 1/1000ème dans leTBS-SNC).

Un rinçage est ensuite effectué avant l'incubation dans du TBS-SNC contenant l'anticorps secondaire biotinylé chèvre anti-IgG lapin. Après un nouveau rinçage le complexe avidine-peroxidase est mis en contact. La ConA couplée à la peroxidase est révélée par le substrat diaminobenzidine (DAB). Les coupes sont colorées au bleu de toluidine (1 ‰, pH = 4,5) avant d'être observées (Dialux 20) et photographiées.

Avant immunodétection, certaines coupes de larves intoxiquées par la ConA à 200, 400 ou 800 $\mu g.ml^{-1}$ ont été incubées pendant 2 h dans une solution de TBS contenant 10 $\mu g.ml^{-1}$ d'α-méthyl-mannoside. Nous espérions ensuite observer une diminution plus ou moins complète de l'intensité de coloration des coupes après immunomarquage.

2.4. Microscopie électronique à transmission (MET)

Nous avons recherché les effets éventuels de la Concanavaline A sur l'ultrastructure des cellules épithéliales du tube digestif de l'espèce *A. pisum*. Ces investigations sont menées sur des larves et non sur des adultes principalement pour des raisons pratiques. Après plusieurs essais infructueux, il s'est avéré impossible d'obtenir une bonne fixation des adultes entiers avec l'abdomen ouvert (pour favoriser la pénétration des fixateurs). Une amélioration de la technique aurait du être obtenue en disséquant le tube digestif pour ne fixer que cet organe. Mais nous n'avons pas obtenu un gain sensible de la qualité des coupes réalisées dans des échantillons préparés ainsi. La dissection elle-même pourrait induire des artéfacts. En effet, après décapitation des adultes, le tube digestif est étiré pour être prélevé. Cet étirement peut provoquer des dommages au niveau des cellules épithéliales, qui rendent éventuellement difficilement discernables d'éventuelles lésions liées à l'intoxication elle-même.

Des larves néonates sont préalablement intoxiquées pendant 48 h sur des milieux artificiels simples ou contenant de la ConA à 200, 400 ou 800 $\mu g.ml^{-1}$. Elles sont ensuite fixées l'abdomen ouvert dans un tampon phosphate[78] contenant 1 % de glutaraldéhyde et 0,5 % de paraformaldéhyde (osmolarité totale mesurée ≈ 400 mOsM), pendant 20 heures à température ambiante[79].

A l'issue de ce traitement, les échantillons sont lavés dans du tampon phosphate 0,175 M, seul (en légère hyperosmolarité 360 mOsM), à froid (+4°C), dans 5 bains d'une heure. Les larves sont post-fixées dans du tampon phosphate 0,2 M contenant 2 % de tétroxyde d'osmium (OsO4), pendant 2 h à température ambiante. Les échantillons sont déshydratés par traitement éthylique standard et inclus dans de la LR White (London Resin White) selon le protocole décrit par Newman et *al*. (1982 ; fiche-protocole N° 22C). Les coupes sont effectuées avec un diamant (épaisseur ≈ 100 nm). Elles sont montées sur des grilles recouvertes de Formvar[80] et contrastées à l'acétate d'uranyle à 7 % dans l'alcool méthylique[81]. Elles sont observées sous un microscope électronique à transmission Philips CM 120.

L'ensemble de ce travail de préparation des coupes et de leurs observations a été réalisé avec l'aide du personnel du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie et à la Géologie (CMEABG) de l'Université Claude Bernard - Lyon 1.

78 Tampon phosphate (Sorensen), monosodique dipotassique, pH = 7,2. Voir fiche protocole n° 21.

79 Les fiches protocole n° 22A et 22B donnent la composition des solutions utilisées et détaillent les étapes de fixation et de déshydratation.

80 Membrane support de 100 à 200 Å évitant à la coupe d'être abimée sous le faisceau d'électrons.

81 Technique utilisée au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie et à la Géologie de l'Université Claude-Bernard Lyon 1.

2.5. Analyse des acides aminés libres de puceron entier et de miellat

2.5.1. Principe du dosage par chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations

Les acides aminés libres de pucerons entiers et de leur miellat, après intoxication sur milieux contenant de la Concanavaline A, sont dosés par chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations.

Dans ce procédé, la colonne est remplie d'une résine synthétique contenant des groupements sulfoniques (SO_3), préalablement équilibrée avec une solution acide de façon à ce que ces groupements soient complètement "chargés" par H^+. A la résine sous forme H^+ est ajoutée la solution acide (pH = 2,5) du mélange d'acides aminés, maintenant les aminoacides sous forme de cations. Sous cette forme, ils ont tendance à déplacer les protons liés aux particules de résine et donc à s'y fixer. L'importance des déplacements varie faiblement selon les différents aminoacides en raison des différences légères dans leur degré d'ionisation. A pH = 2,5, la plupart des acides aminés basiques (lysine, arginine et histidine) sont solidement liés à la résine par des forces électrostatiques, et les plus acides (acide glutamique et acide aspartique) sont les moins liés. Lorsqu'on augmente graduellement le pH, la température et la concentration en lithium des tampons aqueux d'élution, les aminoacides acides migrent dans la colonne à des vitesses différentes et peuvent être parfaitement séparés. Le cycle d'analyse, comprenant la régénération, dure environ 2 h, l'arginine éluant en ≈ 125 min. Ils sont analysés quantitativement en sortie de colonne par une réaction à la ninhydrine et un détecteur spectrophotométrique, à double longueur d'onde (autoanalyseur System 6300, Beckman Inc., USA).

2.5.2. Préparation des extraits de miellat et de pucerons entiers pour les dosages des acides aminés libres.

Des jeunes adultes (5x25) sont transférés sur des milieux standards Ap2 contenant 0, 200, 400 ou 800 µg.ml^{-1} de ConA. Le miellat excrété tombe dans une coupelle. Après 48 h d'intoxication, il est récolté indépendamment dans chacune des cinq coupelles de chaque modalité par deux rinçages de 100 µl d'eau distillée et récupéré dans un tube Eppendorf préalablement pesé à vide. Les échantillons sont ensuite déshydratés au Speed-Vac et l'Eppendorf est à nouveau pesé pour estimer les poids secs de miellat récolté.

Les pucerons témoins ou intoxiqués sont pesés et répartis dans des Eppendorfs à raison de 5 mg de pucerons environ par tube. Les échantillons de miellat et de pucerons sont conservés à - 20°C quelques jours dans l'attente de l'extraction des acides aminés libres (fiche-protocole N° 24) et de leur dosage chromatographique.

3. Résultats

3.1. Les tissus cibles de la Concanavaline A

Les résultats du chapitre précédent démontrent que les pucerons même fortement intoxiqués continuent de s'alimenter et ingèrent de grande quantité de Concanavaline A. Une question était donc de savoir s'ils excrètent la lectine ou si celle-ci est retenue ou dégradée dans le tube digestif. Nous avons donc essayé de mettre en évidence la présence de ConA dans le miellat de pucerons intoxiqués, par visualisation électrophorétique directe puis par détection immunologique.

3.1.1 Electrophorèse d'extraits de miellat

Des extraits secs de miellat excrété par des pucerons laissés 72 h sur des milieux contenant de la ConA à 100 µg.ml^{-1} ou/et de la peroxydase (protéine témoin) à 100 µg.ml^{-1}, sont passés en électrophorèse :

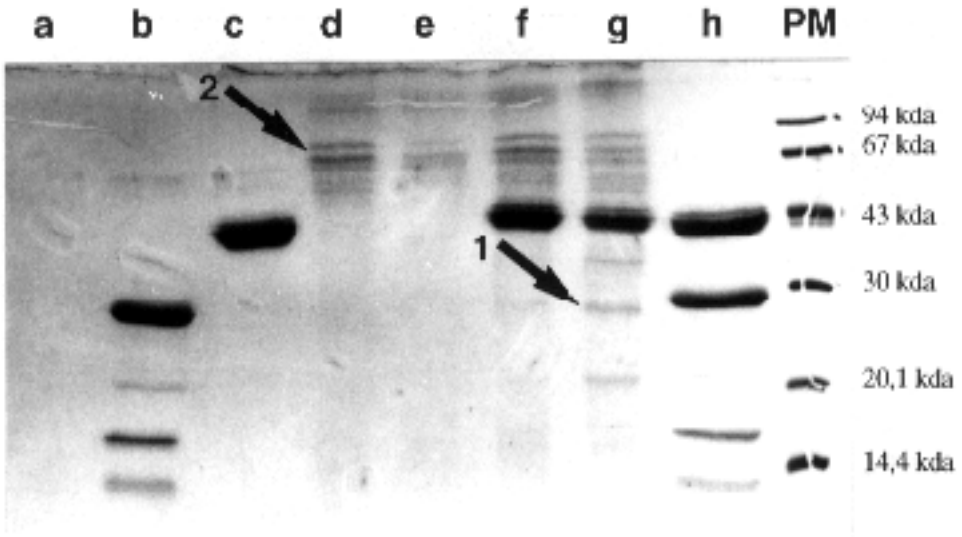


Figure 40 - Comparaison des profils électrophorétiques d'extraits secs de miellat de pucerons laissés 72 h sur des milieux standards simples (d), contenant 100 µg.ml-1 de ConA (e), ou 100 µg.ml -1 de peroxydase (f), ou les 2 protéines à ces mêmes concentrations (g).

Profils témoins : extraits secs de milieu Ap2 (a) ; extraits secs de milieu contenant de la ConA(b) ; de la peroxidase (c) ; ou les deux protéines (h); profils des marqueurs de poids moléculaires (PM). Ces profils correspondent à environ 5 µg de protéines déposées.

Sur les profils b et h, seule une bande majeure à 27 kDa et trois plus petites bandes apparaissent. La bande majeure correspond bien au poids moléculaire des sous-unités de la ConA. La lectine dissoute dans les milieux ne semble pas pure ou serait légèrement dégradée : les trois bandes mineures proviennent de celle-ci et non du milieu Ap2[82]. La peroxydase se caractérise par une seule bande à 44 kDA (profils c et h).

Sur les profils électrophorétiques des miellats f et g, une seule bande majeure est révélée, montrant que seule la peroxydase est massivement excrétée. La ConA n'est pas (profil e) ou

[82] Le milieu Ap2 ne contient pas de protéines dans sa composition (figure 40, profil a). Cependant, certaines expériences révèlent quelques contaminations des milieux, et donc des miellats correspondants (le coulage des milieux en conditions stériles rigoureuses n'étant pas systématiquement réalisé pour les expériences de courtes durées).

très faiblement (profil g) détectée dans les miellats. La bande notée par la flèche 1 ne correspond d'ailleurs vraisemblablement pas à la lectine ; comme les autres bandes mineures désignées par la flèche 2, elle correspondrait plutôt à un polypeptide qui serait un produit de dégradation (excrétion / desquamation) des cellules épithéliales[83]. Il ne semble pas y avoir de polypeptide majeur de dégradation de la conA (peu de bandes de faible PM), mais seule une détection sensible par immuno-empreinte (Western Blot) pourrait confirmer ce point.

3.1.2 Dosage ELISA d'extraits de miellat

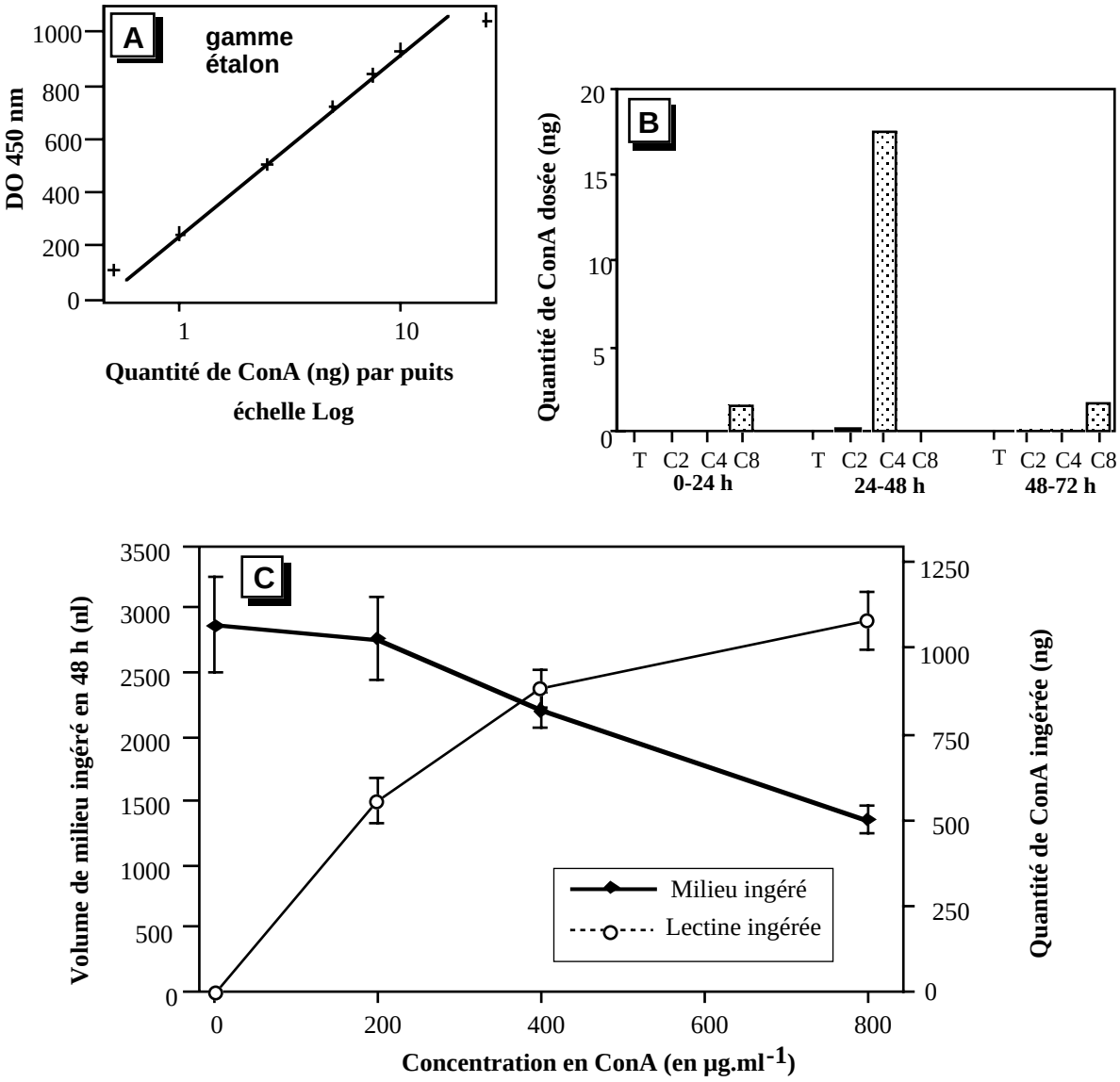


Figure 41 - Estimations : **B** : des quantités de ConA excrétées dans le miellat de pucerons laissés 72 h sur milieu contenant 200 (C2), 400 (C4) ou 800 (C8) µg.ml^{-1} de lectine (dosage ELISA) ; **C** : des quantités de ConA ingérées en 48 h par des pucerons sur ces différents types de milieu (dosage à l'aide d'un marqueur radioactif). **A** : gamme étalon dosage ELISA.

83 Les cellules intestinales ont une vie brève subissant donc un turn-over assez rapide. Elle sont remplacées par des cellules basales (Raccaud-Schoeller, 1980).

La technique ELISA permet de doser la ConA dans des extraits de miellat de pucerons intoxiqués avec une beaucoup plus grande sensibilité que la technique d'électrophorèse. Après un dosage en "sandwich", nous obtenons une gamme de sensibilité comprise entre 1 et 30 ng de lectine déposée par puits (matériel & méthodes).

Pour ce dosage des extraits secs de miellat, comme pour les dosages ELISA suivants, nous avons établi une gamme étalon. Nous obtenons une parfaite linéarité dans la gamme 1-10 ng (figure 41A). Cette gamme permet de déduire les quantités de lectine (en ng) dosées dans les miellats (figure 41B) :

Après 24 h d'intoxication, nous détectons de la lectine uniquement dans les miellats des pucerons très fortement intoxiqués. Encore cette quantité est-elle très faible, nous sommes en effet à la limite du seuil de sensibilité. La lectine est trouvée en un peu plus grande quantité dans le miellat qui est rejeté entre la 24ème et la 48ème heure d'intoxication, mais principalement pour les pucerons intoxiqués à la concentration de 400 $\mu g.ml^{-1}$: la ConA n'est en effet pas détectée dans le miellat des pucerons faiblement ou fortement intoxiqués. Entre 48 et 72 heures d'intoxication, seuls les pucerons sur milieux ConA800 rejettent en très faible quantité de la ConA. Au moment de la récolte des miellats des gouttelettes d'excrétion sont visibles. Elles sont cependant beaucoup plus petites et plus éparses pour la modalité ConA800.

Malheureusement, nous n'avons pas pu quantifier le volume ou le poids sec de miellat récolté. Les quantités prélevées sont beaucoup trop faibles pour ne pas conduire à une estimation erronée.

Nous proposons une interprétation de ces observations dont la cohérence n'est pour le moins pas immédiate :

- modalité **ConA200** : même après 48 h d'intoxication le **tube digestif** des pucerons n'est **pas saturé** en lectine. Ces derniers n'excrètent donc pas de ConA puisque toute celle qui est ingérée est fixée. Les résultats de la figure 41C peuvent conforter cette interprétation[84] : en 48 h, un adulte sur milieu contenant 200 $\mu g.ml^{-1}$ de ConA ingère environ 500 ng de lectine alors qu'un adulte très fortement intoxiqué (ConA800) en ingère le double (1100 ng).

- modalité **ConA400** : après 24 h d'intoxication le tube digestif est **partiellement saturé**. Bien qu'intoxiqués, les pucerons continuent d'ingérer du milieu en assez grande quantité et donc de la ConA (900 ng en 48 h, figure 41C). La lectine ingérée ne peut être entièrement retenue et on en retrouve dans le miellat. Un rapide calcul permet cependant de constater que la quantité excrétée est négligeable par rapport à la quantité retenue : les quantités de miellat récoltées correspondent aux excrétions de 75 jeunes adultes ; un adulte sur milieu ConA400 ingère environ 880 ng de lectine en 48 h, et nous avons donc dans ces conditions un taux d'excrétion n'excédant pas 0,03 %.

- modalité **ConA800** : le tube digestif est **très vite saturé** en lectine. Dès 24 h, nous en détectons une très faible quantité dans les miellats. Mais à cette très forte concentration, les pucerons sont rapidement extrêmement perturbés. Nous pensons qu'entre la 24ème et la 48ème heure, ils n'ingèrent d'ailleurs quasiment plus de milieu, même si nous avons constaté qu'ils semblent rester fixés (chapitre 3). Cette interprétation n'est pas contradictoire avec les résultats de la figure 41C si nous considérons que les quantités qui sont ingérées par les pucerons fortement intoxiqués peuvent l'être principalement dans les 24 premières heures. S'arrêtant en partie de s'alimenter, les pucerons n'excrètent presque plus de miellat et *a fortiori* nous ne détectons plus ou très peu de ConA après 24 h d'intoxication.

Cette interprétation nous semble plausible, mais elle repose sur une hypothèse importante que nous avons omise et qui est l'absence de dégradation de la lectine par le tube digestif. Ce point ne peut être tranché dans l'état actuel de nos données, mais les résultats suivants sur le contenu peptidasique du tube digestif d'*A. pisum* montrent que cette dégradation à toutes les chances d'être faible sur les périodes expérimentales étudiées dans cette partie.

---

84 Nous avons repris ici les données de la figure 33.

*3.1.3. Profil enzymatique du tube digestif d'***A. pisum** *et devenir de la ConA ingérée*

L'étude du profil enzymatique du puceron du pois *A. pisum* (puceron entier, tube digestif, glandes salivaires, miellat) a fait l'objet d'une publication récente (Rahbé *et al.*, 1995). Nous ne reprendrons ici que les résultats se rapportant à l'activité peptidasique des différentes sections du tube digestif. Nous renvoyons à la publication pour les détails concernant la technique de dosage semi-quantitatif utilisée (système API, Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Paris).

L'activité peptidase est détectée dans trois régions distinctes du tube digestif : l'estomac, l'intestin (qui constituent le mésentéron) et le rectum (nous définissons très précisément ces termes dans le paragraphe suivant consacré à l'anatomie du tube digestif). Une différence marquée apparaît entre les deux parties du mésentéron et le rectum au niveau de leur profil en aminopeptidases.

La plupart des dipeptidyl et oligopeptidyl aminopeptidases ne sont pas détectées dans le rectum, ainsi que certaines des mono-aminoacyl aminopeptidases dosées (Asp, Glu, γ-Glu, His, Hpro et Ile aminopeptidases). D'une manière générale, le mésentéron regroupe les plus grandes quantités d'enzymes. La comparaison estomac/intestin ne fait ressortir que peu d'enzymes plus spécifiquement exprimées dans l'estomac. Nous pouvons citer par exemple Arg, βala, Gln, Lys, Met et Orn aminopeptidases ainsi que la dipeptidyl aminopeptidase Gly-Ala. Mais le fait le plus marquant au niveau du profil peptidasique du tube digestif d'*A. pisum* est le contraste entre les quantités élevées en **aminopeptidases** et la quasi-**absence d'endopeptidases** [85], ou tout au moins leurs niveaux d'activité très différents. Ainsi avec les substrats utilisés aucune activité trypsique ou chymotrypsique n'est détectée (exceptée une très faible activité N-benzoyl-leucyl arylamidase dans l'estomac). Nous pouvons donc conclure que **le tube digestif ne présente pas le bagage enzymatique nécessaire pour dégrader activement la Concanavaline A**.

Les profils électrophorétiques de broyats d'estomacs de pucerons intoxiqués présentent une bande à 26 kDa correspondant précisément au poids moléculaire d'une sous-unité ConA :

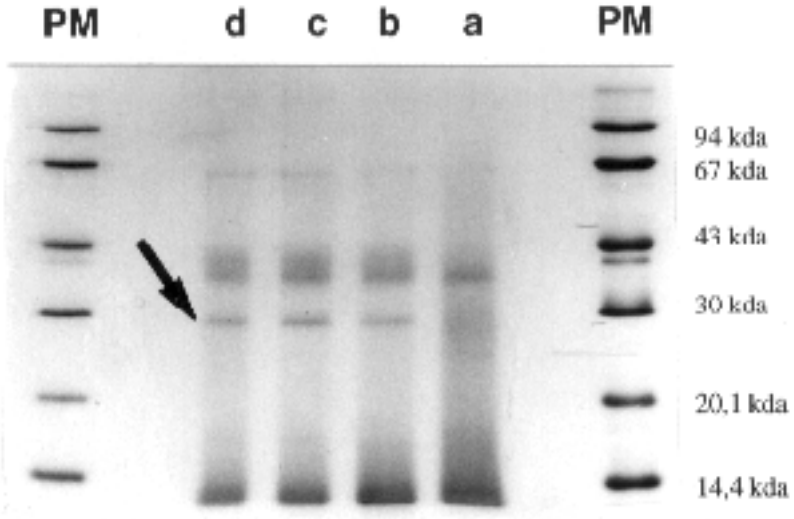


Figure 42 - Comparaison des profils électrophorétiques des broyats d'estomacs de pucerons adultes A. pisum laissés 72 h sur des milieux Ap2 simples (a), ou contenant 200 µg.ml -1 de ConA (b), 400 µg.ml -1 (c) ou 800 µg.ml -1 (d).
PM : profils des marqueurs de poids moléculaires. La flèche indique la bande correspondant au poids d'une sous-unité ConA (≈26 kDa).

85 Les endopeptidases rompent les liaisons peptidiques CO-NH à l'intérieur de grosses molécules protéiques pour les réduire à l'état de peptides.

Cette observation et les études de Nakata et Kimura (1986, 1990) qui montrent que la lectine est très résistante à la protéolyse intestinale chez le rat, nous confortent dans l'idée que la **ConA** ne serait **pas** ou très **partiellement dégradée** dans le **tube digestif**.

Le pH dans la lumière de l'estomac peut être estimé à 6,8 dans l'estomac contre 7,5 dans l'intestin (Rahbé, communication personnelle). Nous avons dit antérieurement qu'il faut un pH inférieur à 5,6 pour que la ConA sous forme tétramérique se dissocie en dimère, et un pH inférieur à 5 pour qu'elle perde sa capacité de reconnaissance des sucres (Liener *et al.*, 1986). La lectine ne serait donc pas non plus dissociée dans le tube digestif.

Les dosages ELISA précédents montrent que des pucerons adultes intoxiqués sont capables d'ingérer de grandes quantités de lectine (≈ 1 µg en 48 h). Si celle-ci n'est pas dissociée, dégradée et/ou excrétée, elle se **fixe** donc dans le tube digestif. Une étude histologique minutieuse nous a permis de décrire l'anatomie de cet organe. Cette étape descriptive nous a semblé essentielle pour comprendre le site et le mode d'action de la ConA.

*3.1.4. Anatomie du tube digestif d'une larve d'***A. pisum** *au dernier stade larvaire (L4)*

Le tube digestif des insectes comprend trois parties anatomiquement et histologiquement bien différenciées :

- le stomodeum (ou intestin antérieur),

- le mésentéron (ou intestin moyen)

- le proctodeum (ou intestin postérieur).

Le stomodeum et le proctodeum qui sont des dérivés ectodermiques, présentent un revêtement cuticulaire comportant donc de la chitine. Le mésentéron peut être considéré (au moins dans certains cas), comme une formation endodermique (Raccaud-Schoeller, 1980).

L'organisation générale du tube digestif d'*A. pisum* paraît relativement simple comparée à celle d'autres insectes, voire d'autres Homoptères (Grassé, 1951). Nous avons reconstitué celle-ci par superposition de coupes sériées d'une larve de stade 4 (figure 43). Les circonvolutions ("boucles") du tube digestif, le diamètre de ses différentes parties et leurs superpositions dans des plans différents représentent au mieux la réalité.

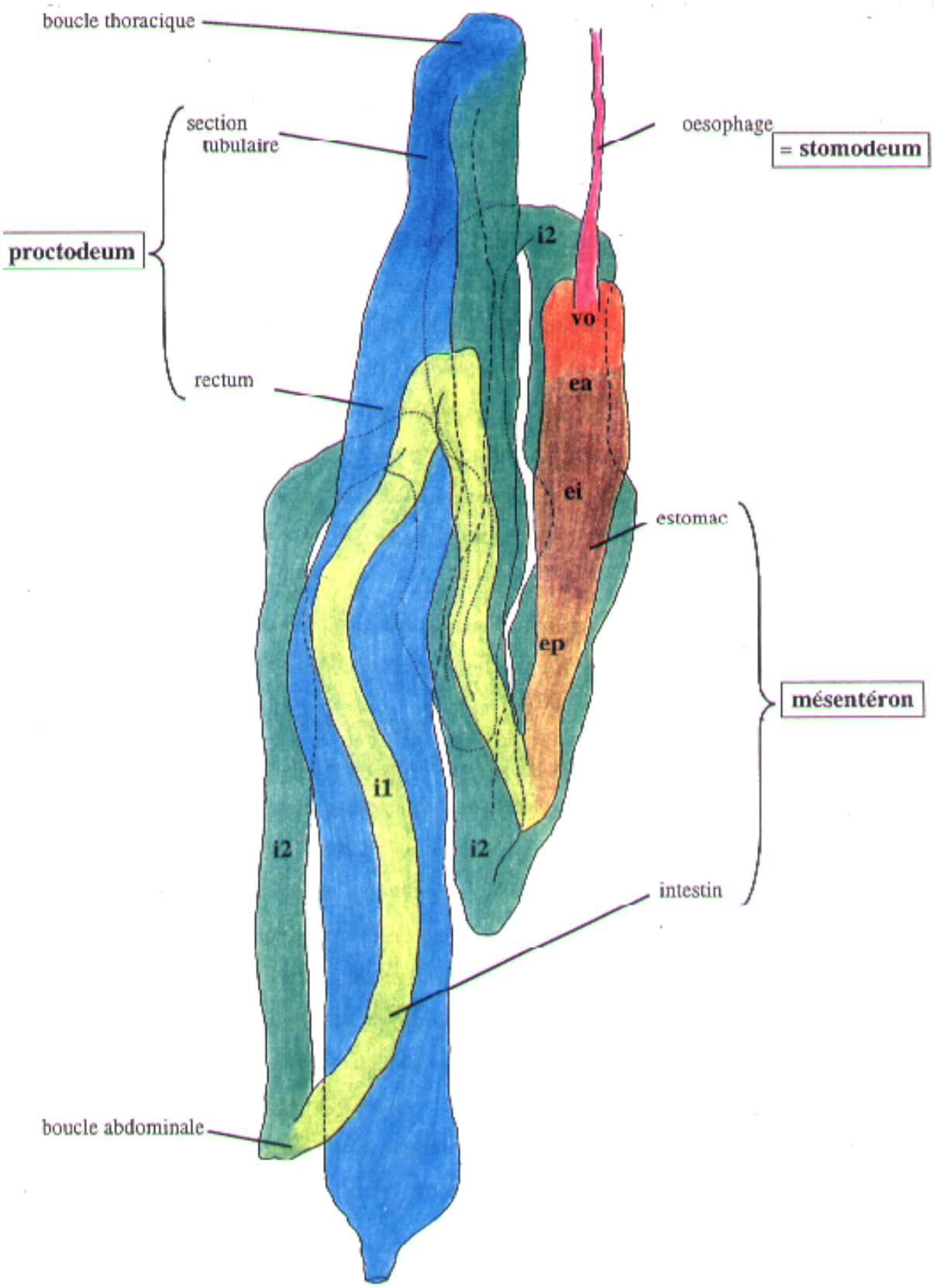
Les représentations schématiques des coupes longitudinales ou transversales des figures 44, 45 et 54 sont le fruit du remarquable travail de Ponsen (1972).

3.1.4.1. Le stomodeum

Le stomodeum est un tube fin uniforme s'étendant de la bouche au mésentéron. Il semble donc constitué uniquement d'un oesophage (noté **oe** sur la figure 43). Nous ne distinguons pas de dilatation stomodéale ou de diverticules signalant la présence d'un jabot.

L'oesophage est constitué d'une simple couche de cellules épithéliales squameuses qui sécrètent une *intima* chitineuse (figure 45A). La valvule oesophagienne est une invagination de l'oesophage dans l'estomac. Elle est constituée de deux couches cellulaires : la couche intérieure est la continuité de celle de l'estomac ; la couche extérieure est constituée de cellules quasi-cubiques. Ces deux couches sont séparées par un espace contenant un matériau fibrilleux.

Bien que non liée à des fibres musculaires, la fonction de la valve est vraisemblablement d'empêcher le flux-retour de l'aliment liquide de l'intestin moyen vers l'intestin antérieur.


boucle thoracique
section tubulaire
proctodeum
rectum
oesophage
= stomodeum
i2
vo
ea
ei
ep
estomac
mésentéron
i1
i2
i2
intestin
boucle abdominale

3.1.4.2. Le mésentéron

Le mésentéron constitue la plus grande partie du tube digestif. Il se compose :

-1) d'une partie tubulaire et dilatée que nous appelons "estomac" par analogie avec le terme employé par Ponsen (1972 ; 1987) ;

-2) d'un tube plus fin, très long et replié en huit boucles. Nous le désignons par le terme "intestin". La transition entre ces deux parties anatomiques est marquée par une boucle. Nous n'observons pas de caeca gastriques s'ouvrant au voisinage de la valvule oesophagienne. Le mésentéron est entouré par une *tunica propria* similaire à celle de l'oesophage. Son épithélium est composé d'une couche monocellulaire simplement séparée de l'hémolymphe pas une lame basale et la *tunica propria* (figure 54).

L'**estomac** d'*A. pisum* présente de grandes analogies avec celui de *M. persicae* décrit par Ponsen (1972). Trois sections diffèrent par leurs caractéristiques morphologiques et histologiques :

- la région antérieure se compose de cellules quasi-cubiques,

- la région médiane (ou intermédiaire) se caractérise par des cellules columnaires. Elles sécrètent des matériaux par constriction cellulaire de la surface apicale,

- la région postérieure se compose de cellules cuboïdales qui sécrètent des matériaux par bourgeonnement de la membrane apicale (figure 45C et figure 54). Ponsen observe que les deux processus de sécrétion se déroulent durant tout le stade larvaire et se poursuit pendant la vie adulte sans aucune dégénération ou multiplication des cellules.

A plus fort grossissement, les cellules épithéliales de l'estomac d'*A. pisum* portent à leur face apicale une "bordure striée". Elles semblent présenter les mêmes caractéristiques que les cellules intestinales de vertébrés : microvillosités[86] recouvertes de glycocalix, mitochondries, nombreuses gouttelettes lipidiques. La qualité des coupes ne nous permet pas néanmoins de distinguer du réticulum endoplasmique granulaire et l'appareil de Golgi. Forbes (1964) les décrit chez *M. persicae*.

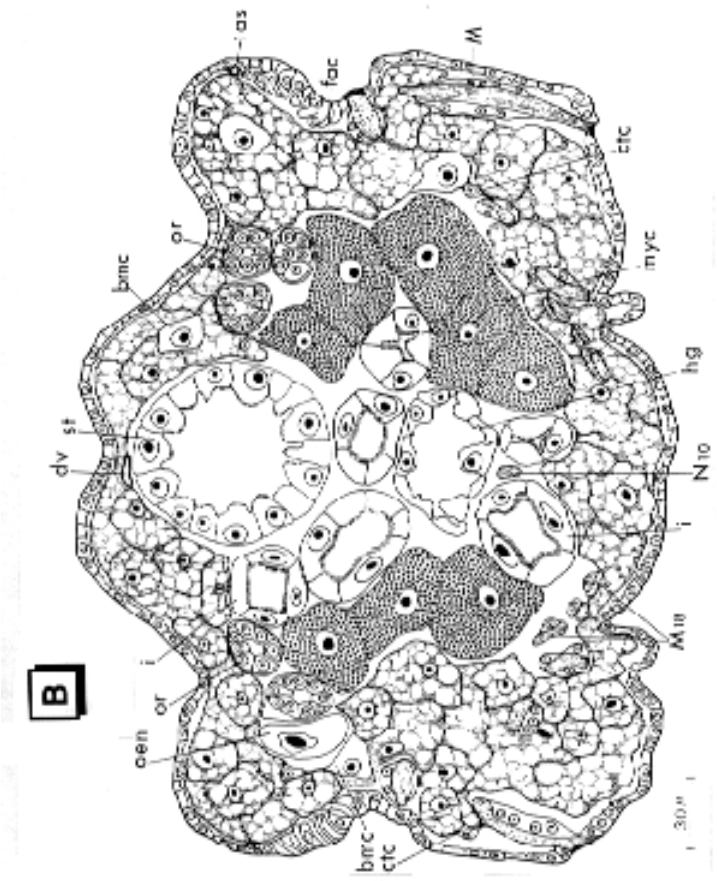
L'**intestin** est la continuation tubulaire de l'estomac. Il est divisé en deux régions. La première d'entre elles s'étend de la boucle en sortie de l'estomac à la boucle abdominale (figure 43). Il existe ensuite une zone de transition jusqu'à la seconde région qui s'élargit. Après une succession de boucles, celle-ci rejoint le proctodeum. Les cellules épithéliales de la première région renferment chacune quelques vacuoles et un noyau quasi-sphérique, alors que celles de la seconde partie de l'intestin sont fortement vacuolisées et ont des noyaux ovoïdes. Les surfaces libres des cellules triangulaires de l'intestin sont striées (les microvillosités apparaissent bien plus longues que celles de l'estomac) et offrent une plus ou moins grande lumière.

Dans la seconde région de l'intestin, en particulier au niveau des boucles situées dans le thorax, Ponsen décrit des triplets de petites cellules, la cellule du milieu possédant un grand noyau spérique alors que les deux autres montrent des noyaux relativement petits.

3.1.4.3. Le proctodeum

La jonction entre le mésentéron et proctodeum est difficile à marquer car aucune valvule pylorique n'apparaît (comme c'est le cas chez beaucoup d'insectes). Nous la situons au niveau de la boucle thoracique (figure 43). Le proctodeum est différencié en une section antérieure tubulaire (d'origine ectodermique) relativement courte, et une section très longue et plus large, le rectum proprement dit. Ponsen (1972) décrit de manière très détaillée cette partie du tube

86 Elles sont cependant beaucoup plus courtes que celles des cellules épithéliales de vertébrés.



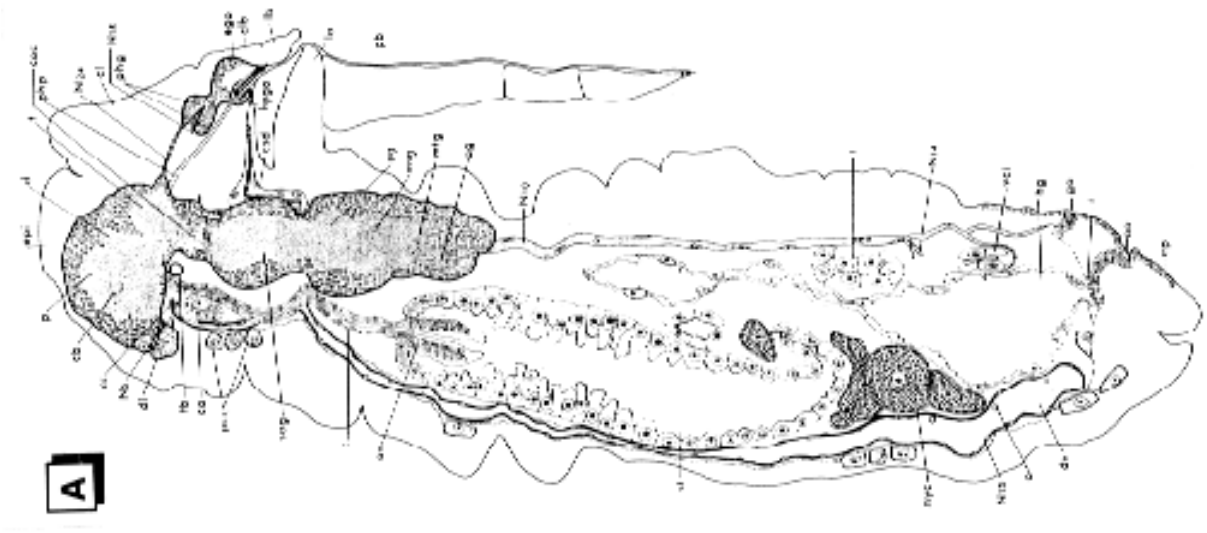


Figure 44 - Vue sagittale (A) et transversale (B) d'une larve de *Myzus persicae* (d'après Ponsen, 1972) montrant en particulier la position de l'oesophage (f), de l'estomac (st), de l'intestin (i) et du rectum (hg). Les autres abréviations sont données en annexe 13.

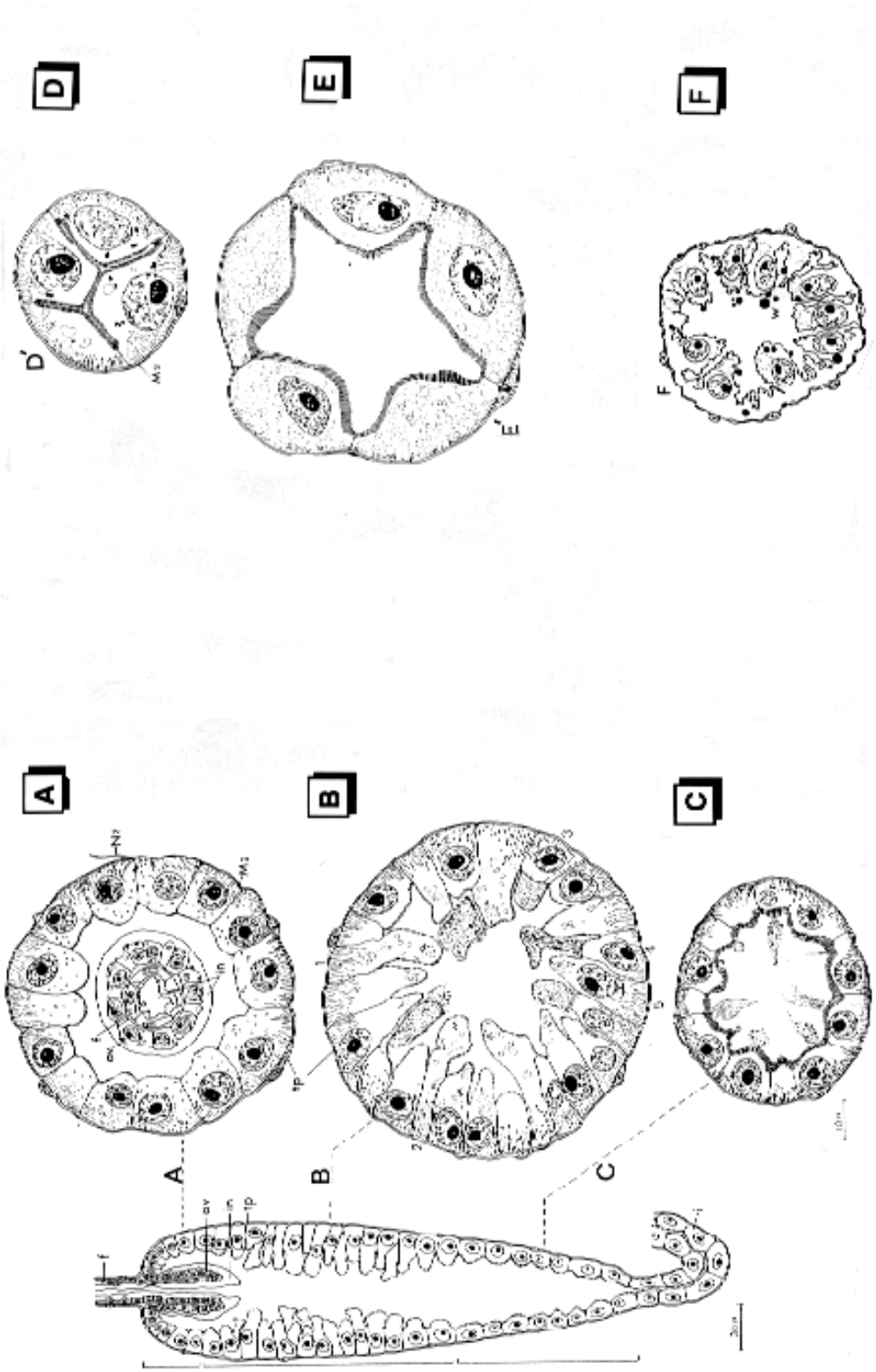


Figure 45 - Section transversale du tube digestif d'une larve de *Myzus persicae* au niveau de l'estomac antérieur (A), de l'estomac intermédiaire (B), de l'estomac postérieur (C), de la première partie de l'intestin (D) et de la deuxième partie de l'intestin (E). la figure F représente une section transversale du tube digestif d'un adulte, *Acyrthosiphon pisum*, au niveau de la section tubulaire du proctodeum (d'après Ponsen, 1972 & 1987).
f : œsophage ; in : intima ; tp : tunica propria ; ov : valvule œsophagienne ; w : gouttelettes circuses. Les autres abréviations sont données en annexe 13.

digestif. Nous retiendrons en particulier que la section antérieure est formée d'une simple couche de cellules squameuses qui font saillie dans la lumière et qui sécrètent des gouttelettes cireuses (figure 45F). Le rectum est lui-même divisé en une région antérieure constituée d'une monocouche cellulaire relativement fine et d'une région postérieure formée par invagination de l'épiderme (figure 44B - vue sagittale).

D'une manière plus générale, nous constatons que le mésentéron ne possède pas de glande à mucus comme chez les vertébrés pour la lubrification des particules alimentaires. Mais cette observation s'applique à tous les insectes (Raccaud-Schoeller, 1980).

Nous n'observons pas non plus de membrane péritrophique[87], un manchon mince et transparent séparant le contenu du tube digestif de l'épithélium et emballant la nourriture pendant son passage le long du mésentéron. Cette formation s'observe chez de nombreux insectes comme les Diptères.

Enfin, *A. pisum* ne possède pas de "chambre filtrante", contrairement à d'autres Homoptères (Drepanosiphidae, Lachnidae notamment). Celle-ci joue un rôle important dans la régulation de la pression osmotique (annexe 11). Les insectes qui ingèrent de grandes quantités de nourriture très liquide doivent en effet lutter contre une dilution excessive de leur hémolymphe et éliminer un excès de liquide des aliments pour faciliter la digestion.

3.1.5. Mise en évidence de la cible primaire de la Concanavaline A dans le tube digestif

Des coupes transversales réalisées sur des larves ayant ingéré de la ConA-FITC montrent que celle-ci se fixe uniquement dans l'estomac (planche I, **es**, couleur verte intense). Aucune fluorescence n'est détectée ici dans l'intestin (**i1, i2**), ni dans le rectum (**re**). Une autofluorescence naturelle apparaît au niveau d'un bactériome (coupe B, **b**, couleur orange soutenue) et au niveau de la cuticule externe (**c**, couleur jaune). La coupe C montre que la lectine se lie sur toute la surface des cellules épithéliales (pôle apical et crypte). La Concanavaline A, dans ces conditions expérimentales (intoxication de 48 h à une concentration relativement faible d'environ 100 $\mu g.ml^{-1}$), ne traverse pas la membrane apicale de ces cellules et *a fortiori* ne traverse pas la "barrière" de l'épithélium stomacal.

Des dosages ELISA réalisés sur des extraits d'hémolymphe et des broyats d'estomac ou d'intestin de pucerons intoxiqués complètent ces premières observations histologiques.

3.1.6. Dosage ELISA de la Con A dans l'hémolymphe

Dans ces conditions expérimentales (100 $\mu g.ml^{-1}$) aucune trace de lectine n'est détectée. Ce type de dosage est pourtant très sensible (seuil de sensibilité 1 ng par extrait déposé). Des dosages sur de plus grands volumes d'hémolymphe ont été effectués sans plus de succès.

La **ConA ne traverserait donc pas la barrière de l'épithélium intestinal**.

---

87 La membrane péritrophique agit comme un ultrafiltre, arrêtant les grosses particules colloïdales mais perméable aux enzymes et aux produits de la digestion

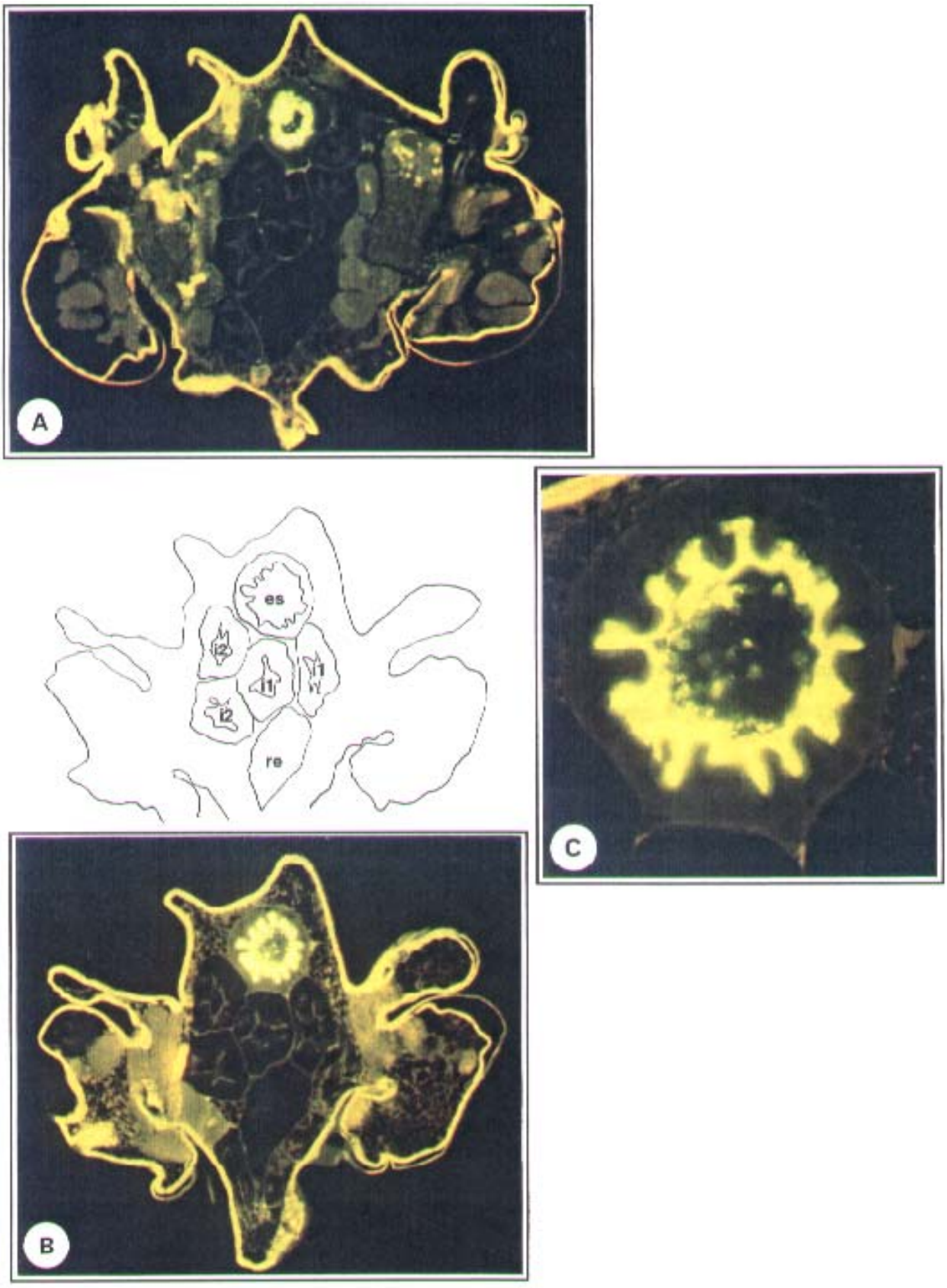


Planche I - Coupes transversales d'une larve d'*Acyrthosiphon pisum* ayant ingéré de la ConA fluorescente : **A :** coupe au niveau de l'estomac antérieur, x 125 ; **B :** coupe au niveau de l'estomac intermédiaire, x 125 ; **C :** estomac postérieur, x 500. Voir le texte pour les abréviations.

3.1.7. Dosage ELISA de la ConA dans l'estomac et l'intestin

L'histofluorescence démontre que la région antérieure du mésentéron, l'**estomac**, est la **cible primaire** de la ConA. Nous ne la détectons pas dans la région postérieure de l'intestin. Ceci peut s'expliquer par deux hypothèses :

-1) la lectine n'est pas capable de se fixer à l'intestin ;

-2) la lectine n'a pas transité par l'intestin.

Notre observation en histofluorescence se rapporte à un puceron intoxiqué à une dose relativement faible. Toute la lectine ingérée serait donc retenue dans l'estomac, qui ne serait pas encore saturé en toxine.

Pour vérifier notre première hypothèse, l'équivalent d'un estomac ou d'un intestin est incubé avec 500 ng de ConA, dans une solution de PBS, pendant 1 h, à + 4°C. Après centrifugation (14000 g, 1 h, + 4° C), nous dosons la lectine restant sous forme solubilisée dans l'extrait (surnageant)[88] et nous pouvons en déduire la quantité de lectine ajoutée qui s'est fixée :

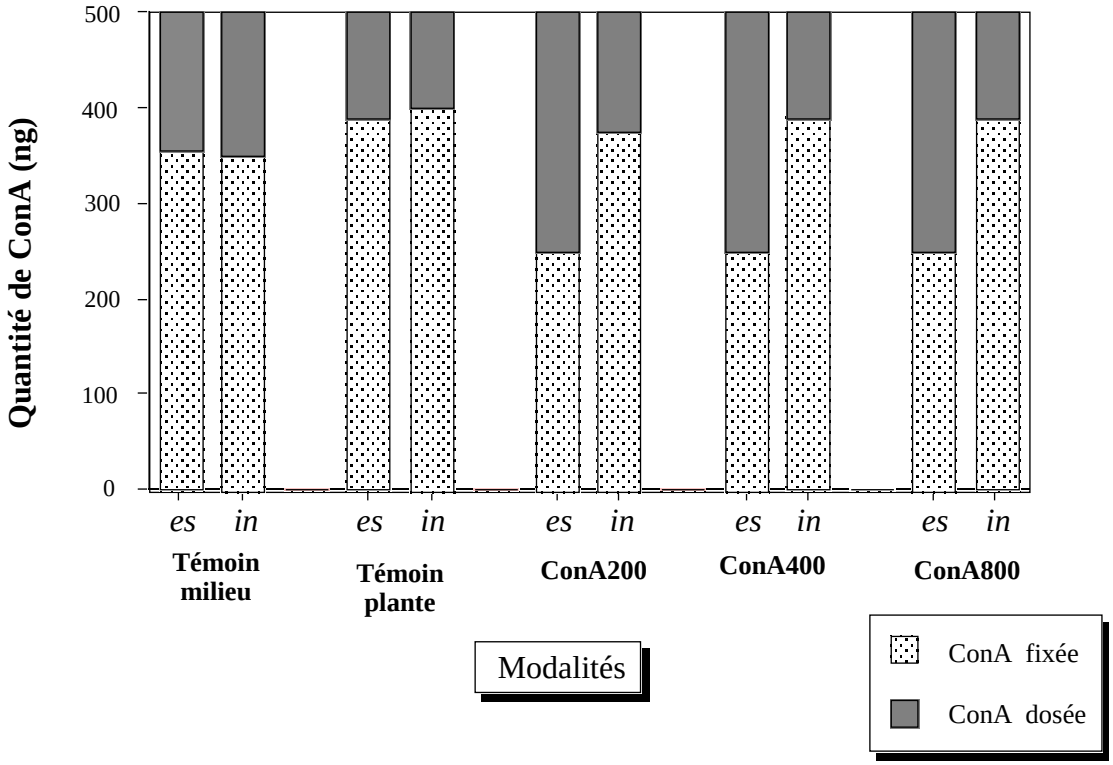


Figure 46 - Dosage ELISA de la ConA dans des broyats de tubes digestifs de pucerons intoxiqués ou non par de la lectine, incubés dans une solution de PBS contenant 500 ng de ConA par équivalent tube digestif.

es : extrait d'estomac ; in : intestin

La figure ci-dessus indique que l'intestin d'un puceron non intoxiqué est capable de fixer les mêmes quantités de lectine que l'estomac. Nous n'observons pas de différence entre les pucerons qui se sont développés sur fève et ceux qui se sont développés sur milieu artificiel. En réalité, nous ne devrions pas parler d'"intestin" ou d'"estomac" mais d'extraits cellulaires

88 La technique ELISA ne permet pas de doser la ConA complexée : des dosages réalisés sur les culots se sont toujours avérés négatifs.

de ces régions du tube digestif. Par extrapolation, nous émettons l'hypothèse que les cellules épithéliales de l'intestin sont capables de fixer les mêmes quantités de ConA que les cellules épithéliales de l'estomac (qui correspond quand même à une portion beaucoup plus courte que l'intestin).

Une deuxième série de dosages a consisté à rajouter de la ConA, dans les mêmes proportions que précédemment (500 ng/extrait), à des broyats de pucerons intoxiqués à 200, 400 ou 800 $\mu g.ml^{-1}$ de lectine.

La figure 46 montre que les "intestins" des pucerons intoxiqués fixent plus de ConA que les "estomacs", et que ce sont ces derniers qui ont perdu une portion de leur capacité de fixation par rapport à la situation témoin (plante ou milieu sans lectine). De plus la proportion ConA libre (dosée) sur ConA ajoutée fixée est identique pour les trois modalités.

La première observation suggère que les estomacs ayant déjà fixé de la lectine sont partiellement saturés. La seconde observation indique que l'estomac d'un puceron intoxiqué à la concentration de 200 $\mu g.ml^{-1}$ fixe les mêmes quantités de lectine qu'un estomac de puceron intoxiqué à la concentration de 400 ou 800 $\mu g.ml^{-1}$.

Il serait intéressant d'estimer la quantité de ConA qu'un estomac est capable de fixer. Pour plusieurs raisons la technique ELISA ne nous permet pas de le faire directement. En effet la lectine soluble des extraits peut être soit de la ConA ingérée et non complexée aux cellules épithéliales, soit de la ConA ingérée complexée et/ou fixée après ajout et partiellement resolubilisée par le Tween 20. De plus, même si nous savions exactement à quoi correspond la lectine soluble dosée, comme nous travaillons sur des débris cellulaires, nous ne pouvons pas estimer par ce protocole la quantité de lectine complexée *in vivo* à la surface des cellules épithéliales.

La seule réponse apportée par la figure 46 serait qu'après avoir incubé l'équivalent d'un estomac de puceron moyennement ou fortement intoxiqué 48 heures, avec 500 ng de ConA, cet **estomac semble se saturer en lectine**.

3.2. Conséquences de l'intoxication par la ConA sur la physiologie d'*A. pisum*

3.2.1. Histopathologie de l'action de la ConA sur A. pisum

La planche II correspond à des coupes transversales au niveau de l'estomac d'une larve normale (coupe A), d'une larve intoxiquée 48 h, à une concentration faiblement toxique de ConA (10 $\mu g.ml^{-1}$, coupe B) et d'une larve fortement intoxiquée (400 $\mu g.ml^{-1}$, coupe C)[89]. Dès la concentration faible, une modification histo-cytologique est décelable : les cellules épithéliales semblent se gonfler (excroissance de la face apicale, coupe C). Les deux coupes A et B sont effectuées à des niveaux identiques de l'estomac (partie intermédiaire).

A la plus forte concentration, les changements cellulaires sont beaucoup plus visibles : les **cellules épithéliales** sont **hypertrophiées**. Sous la bordure striéee, dans les cryptes, le cytoplasme s'éclaircit (D) ; les noyaux ovoïdes s'orientent dans l'axe[90] des cellules épithéliales. La bordure striée est visible et semble se détacher. La lumière de l'estomac est envahie de débris. Mais il est difficile sur ces seules observations de déterminer leur origine (débris membranaires et/ou matériel cytoplasmique).

---

89 Ces doses induisent respectivement en 7 jours des inhibiteurs de croissance d'environ 40 et 75 % (figure 9)

90 Conventionnellement, cet axe correspond à une droite joignant les centres des parties apicale et basale d'une cellule épithéliale.

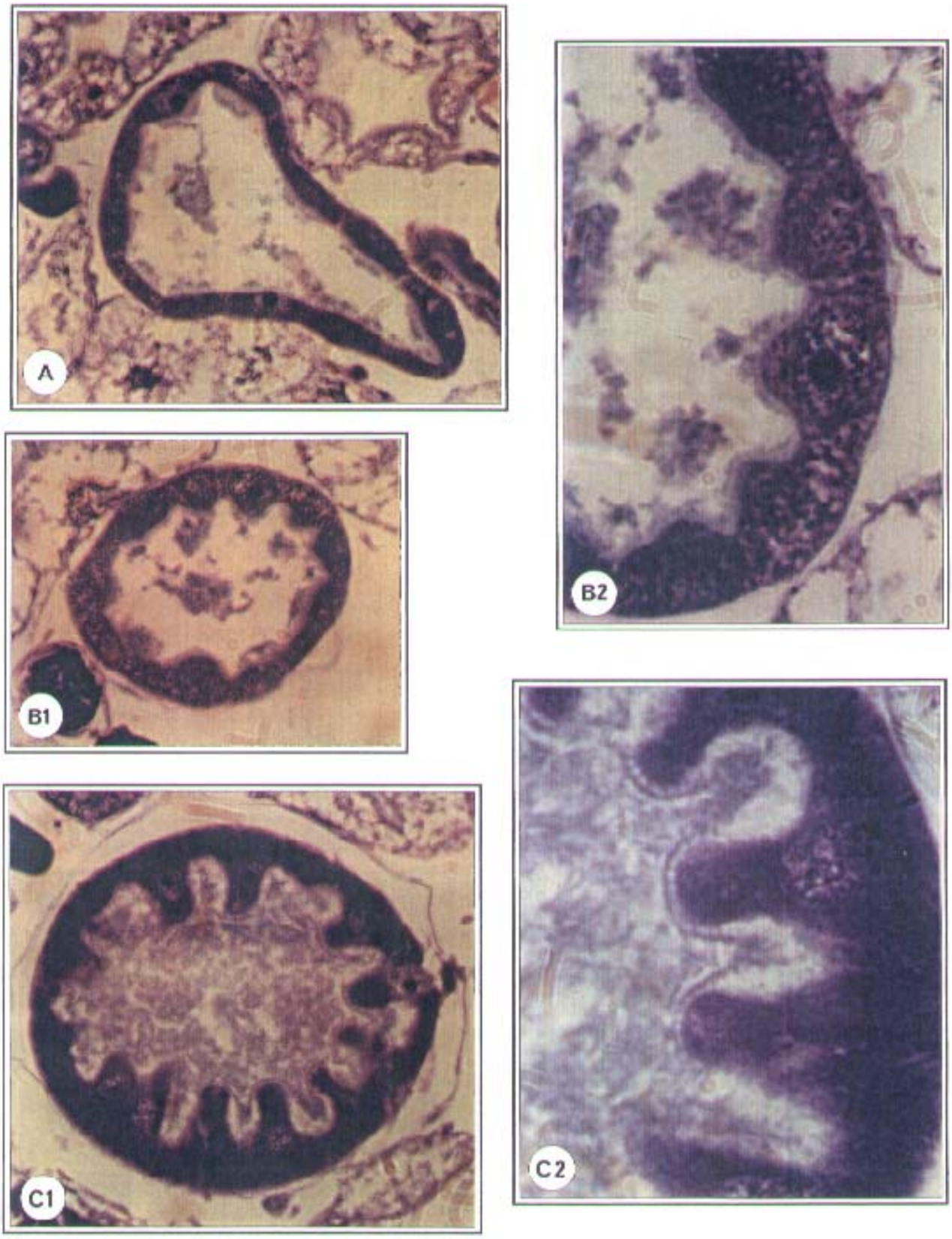


Planche II - Coupes transversales d'une larve d'*Acyrthosiphon pisum* au niveau de l'estomac intermédiaire :
- larve non intoxiquée : **A,** x 500 ;
- larve ayant ingéré du milieu contenant 10 µg.ml^{-1} de ConA : **B1**, x 500 ; **B2**, x 1250 ;
- larve ayant ingéré du milieu contenant 400 µg.ml^{-1} de ConA : **C1**, x 500 ; **C2**, x 1250.

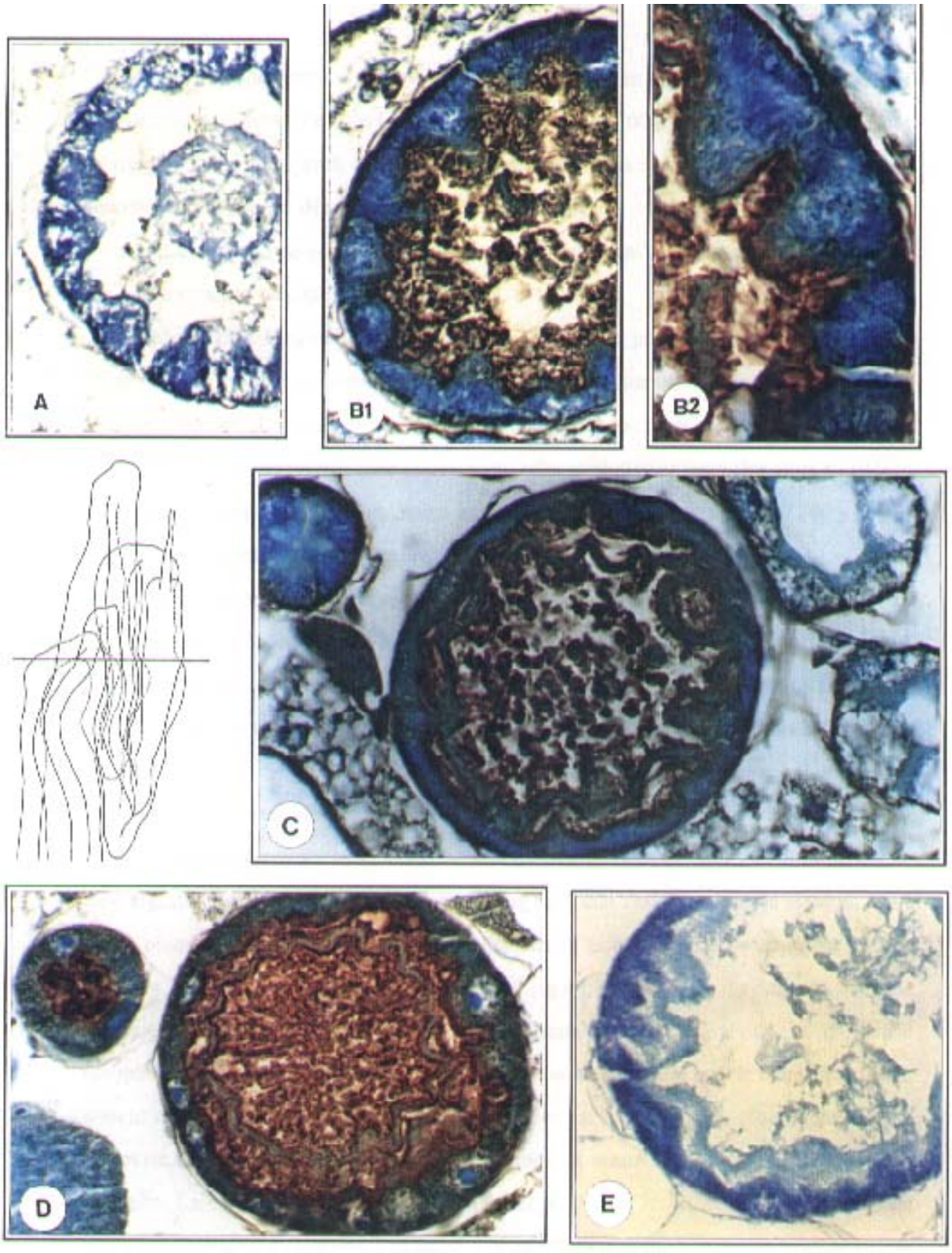


Planche III - Immunohistochimie sur coupes de larves d'*Acyrthosiphon pisum* intoxiquées par la ConA. Les coupes (estomac intermédiaire) sont soumises à un anticorps anti-ConA et la lectine est visualisée par la coloration brune. Toutes les lames sont colorées au bleu de toluidine. Larve non intoxiquée, **A** ; larve intoxiquée à la concentration de 200 µg.ml^{-1}, **B1** & **B2** ; larve intoxiquée à la concentration de 400 µg.ml^{-1}, **C** et 800 µg.ml^{-1}, **D**. Témoin de spécificité, **E** (ConA400). Grossissement x 500 excepté pour B2, x 1250.

L' **immunohistochimie** sur coupe de larves intoxiquées par de la ConA permet une analyse plus fine de l'intoxication cellulaire.

Les trois concentrations choisies (200, 400 et 800 µg.ml^{-1}) marquent une évolution dans l'intoxication aiguë. Sur la planche III, les coupes A, C et D illustrent les effets de ces concentrations respectives au niveau de l'estomac intermédiaire. La couleur marron localise la lectine. La coupe A correspond à un estomac de puceron normal. Le témoin de spécificité est représenté sur la photo E (coupe de l'estomac d'une larve intoxiquée à la ConA400, incubée en présence de sérum antilapin préimmun et non de l'anticorps anti-ConA[91]).

A 200 µg.ml^{-1} (coupe A1), certaines cellules épithéliales semblent simplement hypertrophiées, pour d'autres la membrane apicale se détache par morceaux : des débris membranaires sont retrouvés à proximité immédiate. Ils sont moins marqués que les débris granuleux qui s'accumulent dans la lumière de l'estomac. A 400 µg.ml^{-1}, nous retrouvons ces débris granuleux. Il apparaît de manière très caractéristique que la **membrane apicale se détache avant de se désagréger**. Celle-ci est aussi très visible sur la coupe E. Nous observons ainsi une lyse cellulaire consécutive au décollement de la membrane apicale mais non à la destruction de cette membrane (coupe C).

A 800 µg.ml^{-1}, l'accumulation granuleuse est encore plus dense. Nous retrouvons "l'auréole" dans la lumière stomacale caractérisant le décollement total de la couronne de la membrane apicale. Les cellules épithéliales sont beaucoup moins volumineuses sur la coupe D que sur la coupe A1. A très forte intoxication, elles apparaissent marquées alors qu'elles le sont moins à 400 µg.ml$^{-1,}$ et simplement au niveau de l'excroissance apicale à 200 µg.ml^{-1}. Les noyaux ne semblent pas disparaître.

Ces observations nous amènent à formuler l'hypothèse que la lectine agirait soit uniquement en se fixant à la surface des cellules épithéliales soit en pénétrant partiellement à l'intérieur de ces cellules. L'un ou l'autre de ces modes d'action se traduirait par un remplacement, ou une **accélération du remplacement, des surfaces apicales des cellules stomacales**.

Jusqu'à maintenant, nos commentaires sur l'intoxication cellulaire se sont focalisés sur l'estomac. Mais nous avons aussi recherché si la ConA était détectée dans les autres parties du tube digestif.

Jusqu'à la concentration de 400 µg.ml^{-1} seul l'estomac semble marqué. Nous avons observé de nombreuses coupes sans détecter la lectine ni dans l'oesophage, ni dans l'intestin, ni dans le rectum. Par contre, **à 800 µg.ml^{-1} l'ensemble du tube digestif est marqué** (planche IV, coupe A), à l'exception de l'oesophage et de la valvule oesophagienne (coupe B). La coupe A se situe au niveau de l'estomac antérieur : la boucle thoracique (2ème boucle de l'intestin après l'estomac) en particulier est très marquée.

Nous pensons que l'estomac, à la très forte concentration en lectine, est saturé et que celle-ci transite dans l'intestin. La coupe A nous permet difficilement de décrire les effets de l'intoxication au niveau des cellules intestinales. Les cellules de la première section de l'intestin apparaissent toujours marquées de façon très dense, et tout particulièrement dans la région du pôle apical. La coloration est plus diffuse dans la partie postérieure, peut être simplement parce que moins de lectine transite jusque dans cette région.

---

91 Des coupes de larves intoxiquées à 800 µg.ml^{-1} ou 200 µg.ml^{-1} présentent la même couleur bleue confirmant l'inexistence d'interactions non spécifiques des réactifs utilisés dans notre protocole.

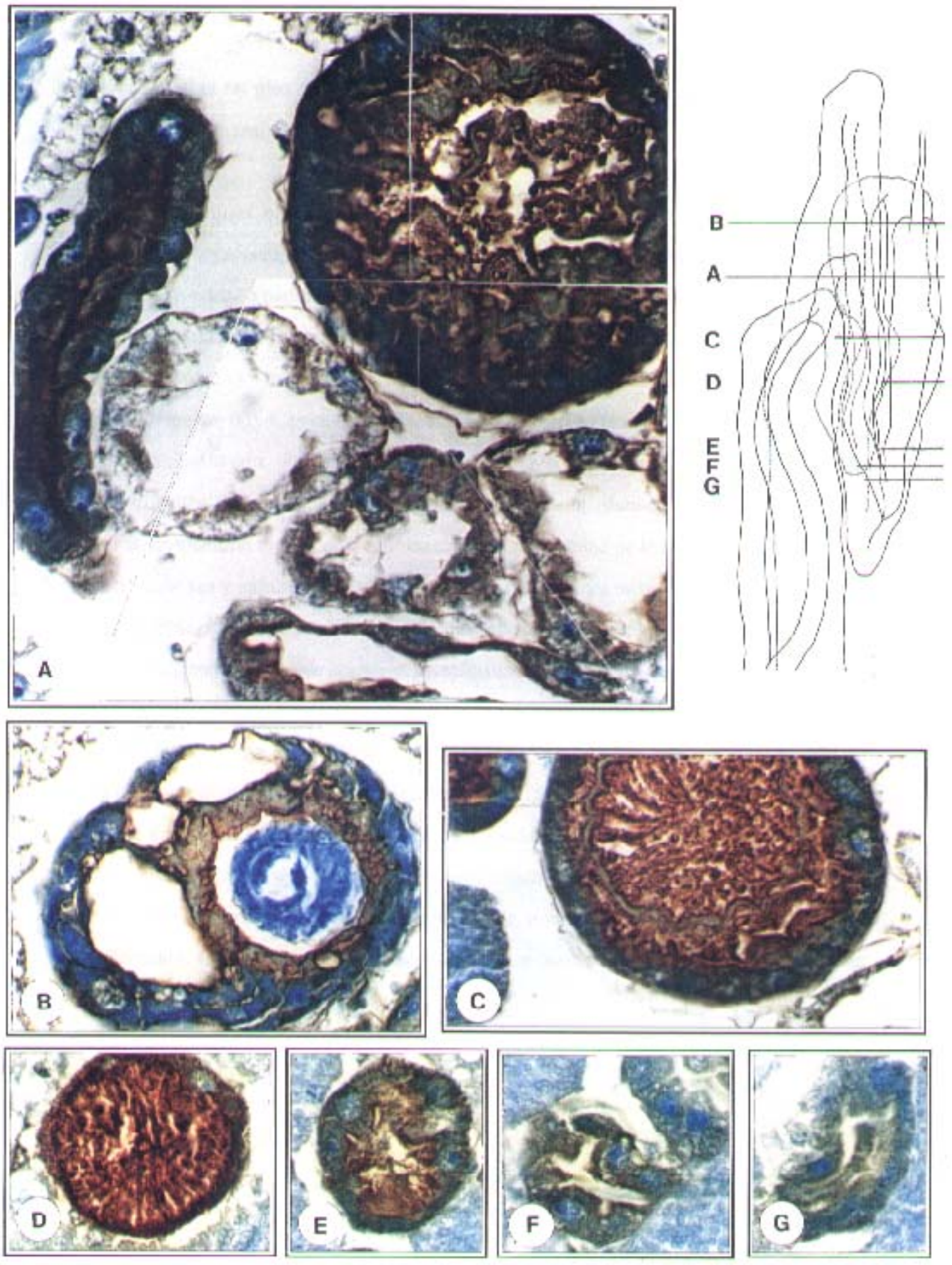


Planche IV - Immunohistochimie sur coupes de larves d'*Acyrthosiphon pisum* intoxiquées par la ConA (800 µg.ml^{-1}). Les coupes localisent la lectine dans les différentes régions du tube digestif.

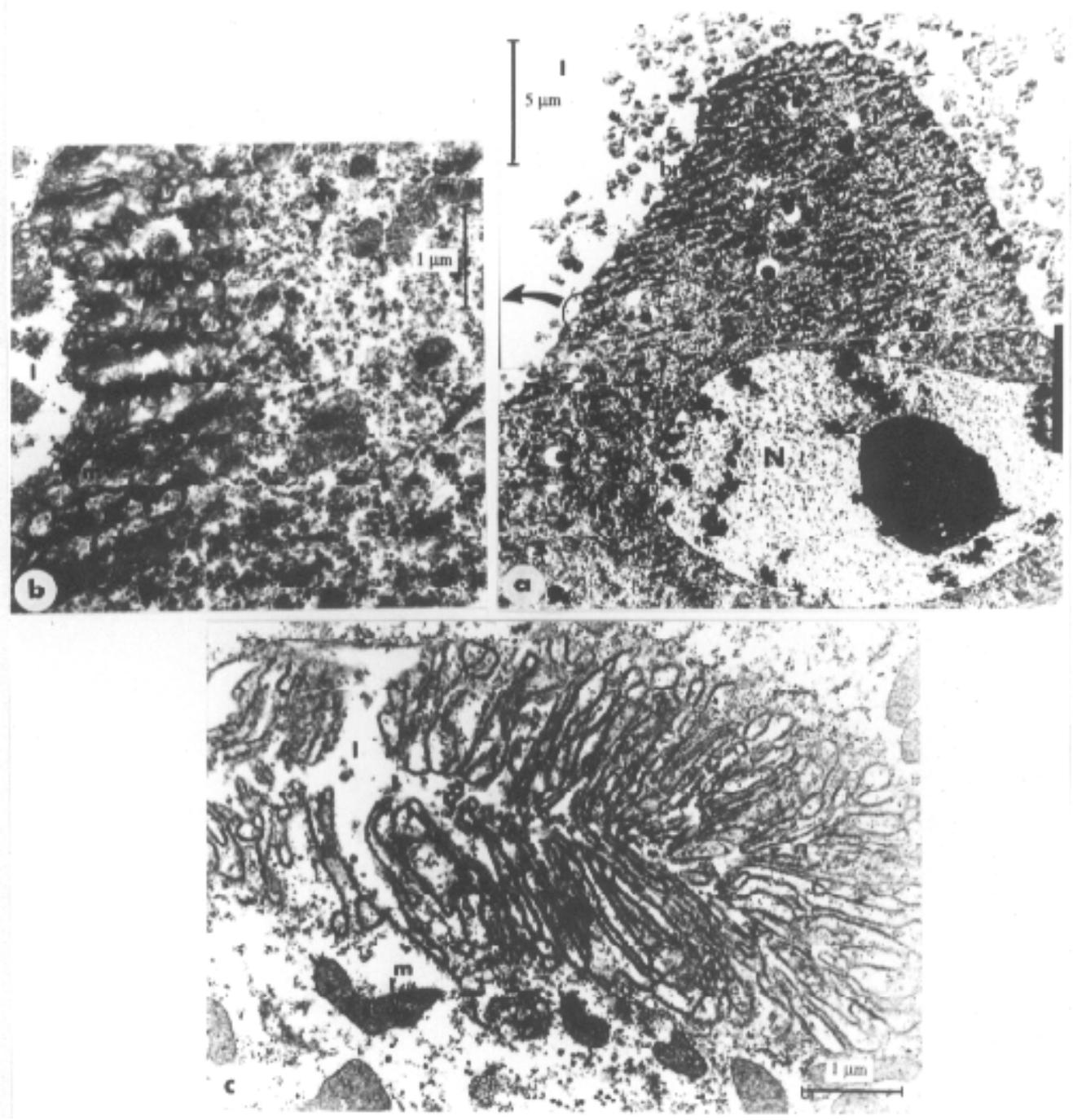


Planche V - Observations au microscope électronique à transmission de l'ultrastructure des cellules mésentériques d'une larve du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* :
a : cellule épithéliale de l'estomac,
b : membrane apicale d'une cellule épithéliale de l'estomac
c : microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin (1ère partie)
l : lumière ; **m :** mitochondrie ; **mv :** microvillosités ; **N :** noyau.
échelle donnée sur chaque coupe.

Les observations effectuées au **microscope électronique** apportent une vision plus détaillée de l'organisation d'une cellule épithéliale de l'estomac (planche V-A).

Nous nous sommes intéressés en particulier aux microvillosités de la bordure striée. Dans l'estomac, elles apparaissent relativement courtes (≈ 1 µm) et de formes irrégulières (B) alors que dans l'intestin (partie i1) dans les replis, elles sont deux à trois fois plus longues (3-4 µm) et de forme homogène (C). Ces coupes, effectuées sur des larves témoins, sont comparées à des coupes réalisées sur des larves intoxiquées à la concentration de 400 $\mu g.ml^{-1}$. Les microvillosités de l'intestin ne présentent aucune lésion (données non montrées) mais l'immunocytochimie montre qu'à cette concentration la lectine ne transite pas jusque là. Elle ne peut donc pas y induire d'éventuels effets sur la structure des microvillosités.

Nous observons sur la planche VI, **deux phases du remplacement d'une bordure striée** : l'ancienne membrane apicale et ses villosités se distinguent clairement au-dessus de la nouvelle.

Sur la coupe A, ce qui paraît être l'ancienne lame basale, se détache partiellement de la nouvelle membrane apicale (flèches), le matériel cytoplasmique abondamment excrété est plus ou moins désintégré, et nous distinguons encore l'ancienne bordure striée.

La coupe B est une vue à plus fort grossissement de la section située entre les deux flèches sur la coupe A. L'ancienne membrane apicale est complètement détachée sur la coupe C. La bordure striée se désintègre. Par contre la surface apicale de la nouvelle cellule ne présente aucune modification. Cette nouvelle cellule semble donc se mettre en place "normalement" avant d'être à son tour la cible de la lectine.

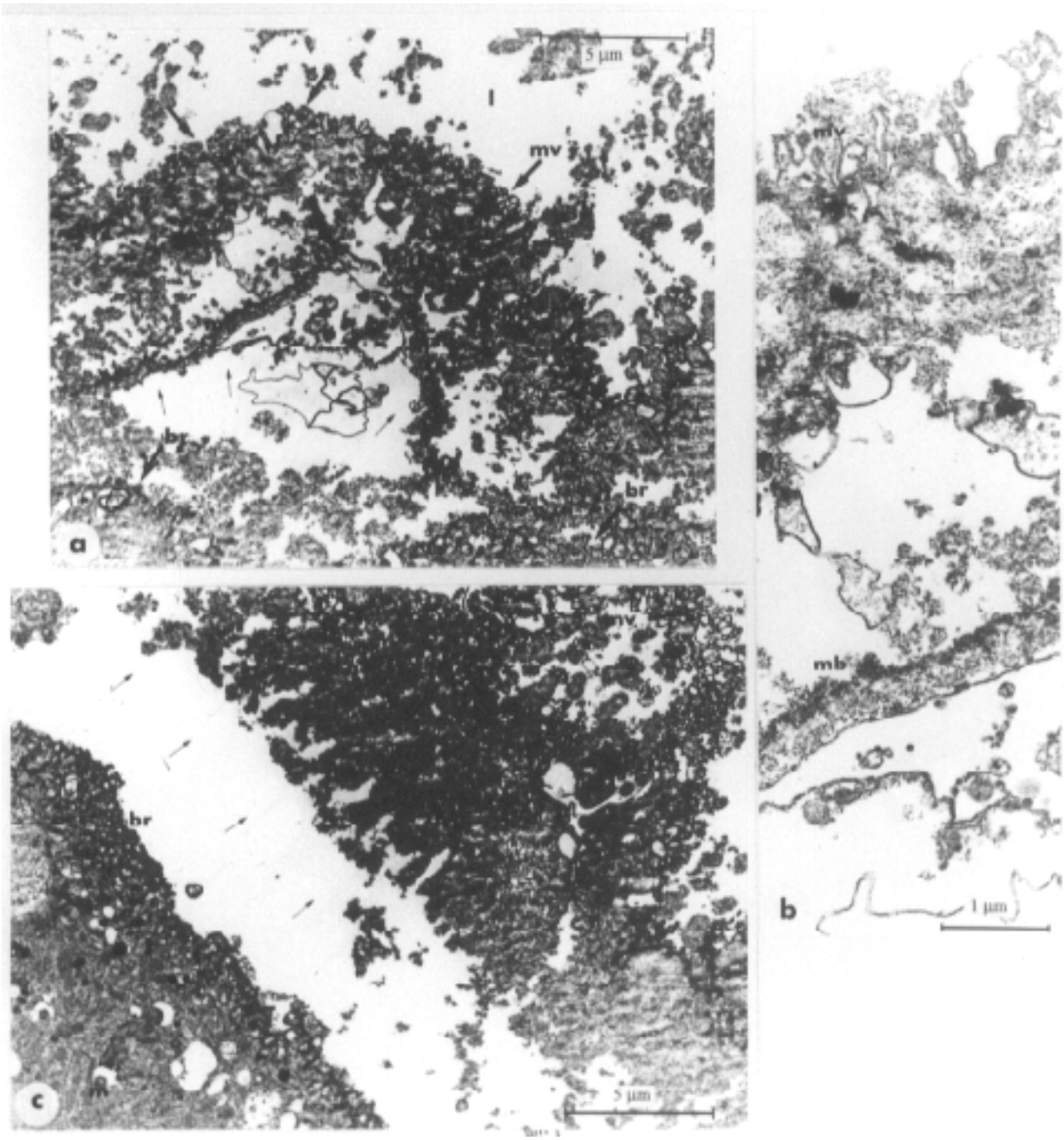


Planche VI - Observations au microscope électronique à transmission de l'ultrastructure de la face apicale d'une cellule mésentérique d'une larve du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* intoxiquée pendant 48 h sur un milieu contenant 400 µg.ml^{-1} de ConA :
a : décollement partiel de la membrane apicale,
b : grossissement sur la membrane apicale décollée,
c : décollement total de la membrane apicale.
br : bordure striée ; **l :** lumière ; **mb :** membrane basale ; **mv :** microvillosités.

échelle donnée sur chaque coupe.

3.2.2. Analyse des acides aminés libres de pucerons entiers intoxiqués avec de la ConA et de la GNA, et de leurs miellats

Nous avons dosé les acides aminés libres de broyats de pucerons adultes laissés 48 h sur des milieux contenant des concentrations plus ou moins toxiques de ConA (200 à 800 µg.ml^{-1}) ou de GNA (5 à 400 µg.ml^{-1}). Le miellat excrété par les insectes est également analysé. Les concentrations en GNA de 5 µg.ml^{-1} et de 20 µg.ml^{-1} ne sont pas toxiques mais induisent au contraire une stimulation significative de la croissance des pucerons (Chapitre 2, figure 13). A 400 µg.ml^{-1}, la GNA induit une inhibition de croissance approximativement identique à celle induite par la ConA à 200 µg.ml^{-1} (IC≈50%, figure 10).

Nous cherchons ainsi à mettre en évidence, avec l'outil diagnostic du profil des acides aminés libres déjà utilisé au laboratoire pour étudier les effets de la symbiose sur *A. pisum* (Liadouze *et al.*, 1995) :

-1) si l'intoxication par la ConA (et la GNA) se traduit par une modification significative et interprétable du profil en acides aminés libres des pucerons et de leur excrétion ;

-2) si l'effet "probiotique" induit par la GNA se traduit aussi par une modification identifiable de ces profils ;

-3) si la modification éventuelle de l'aminoacidémie est identique pour la ConA et pour la GNApar une analyse comparative des profils, soit à concentrations similaires (ConA400 / GNA400), soit à effets toxiques induits similaires (ConA200 / GNA400).

3.2.2.1. Dosages des acides aminés libres des broyats de pucerons entiers

Les représentations schématiques de la figure 47 donnent un aperçu global et très synthétique des résultats obtenus.

La figure 47A représente le **tableau des données brutes** correspondant à 20 acides aminés dosés dans les broyats de pucerons entiers (extraits des modalités ConA et GNA), rapportées aux doses estimées dans les broyats de pucerons normaux. Les quantités totales d'acides aminés sont également comparées au témoin (dernière ligne). Les cercles gris indiquent une valeur supérieure à celle mesurée chez le témoin, et inversement les carrés blancs indiquent une valeur inférieure. La taille des cercles ou des carrés est proportionnelle à la différence lectine-témoin (échelle donnée).

La figure 47B est construite selon le même principe. Les données comparées au témoin correspondent dans ce cas, pour chaque modalité, aux moyennes des concentrations (3 à 5 répétitions) rapportées à la quantité totale (profils en %).
Les données brutes correspondant aux dosages des acides aminés libres des miellats sont également transformées en données relatives par rapport à la quantité totale (profils en %) pour obtenir la figure 49.

Une analyse univariée permet de préciser les différences observées entre les modalités pour chaque acide aminé. Mais la figure 48 est suffisamment explicite pour justifier que nous donnions les résultats détaillés de cette analyse en annexes 12A-C et que nous nous intéressions qu'aux acides aminés variant très significativement d'une modalité à l'autre (quantité au moins multipliée ou divisée par deux par rapport au témoin).

La figure 47A et l'annexe 12A montrent que les quantités totales d'acides aminés libres dosées dans les broyats de pucerons des modalités ConA200, ConA400 et GNA sont du même ordre de grandeur et toutes inférieures à celle de la modalité témoin. Par contre, cette différence n'est pas observée pour les pucerons fortement intoxiqués par la ConA. Leur profil

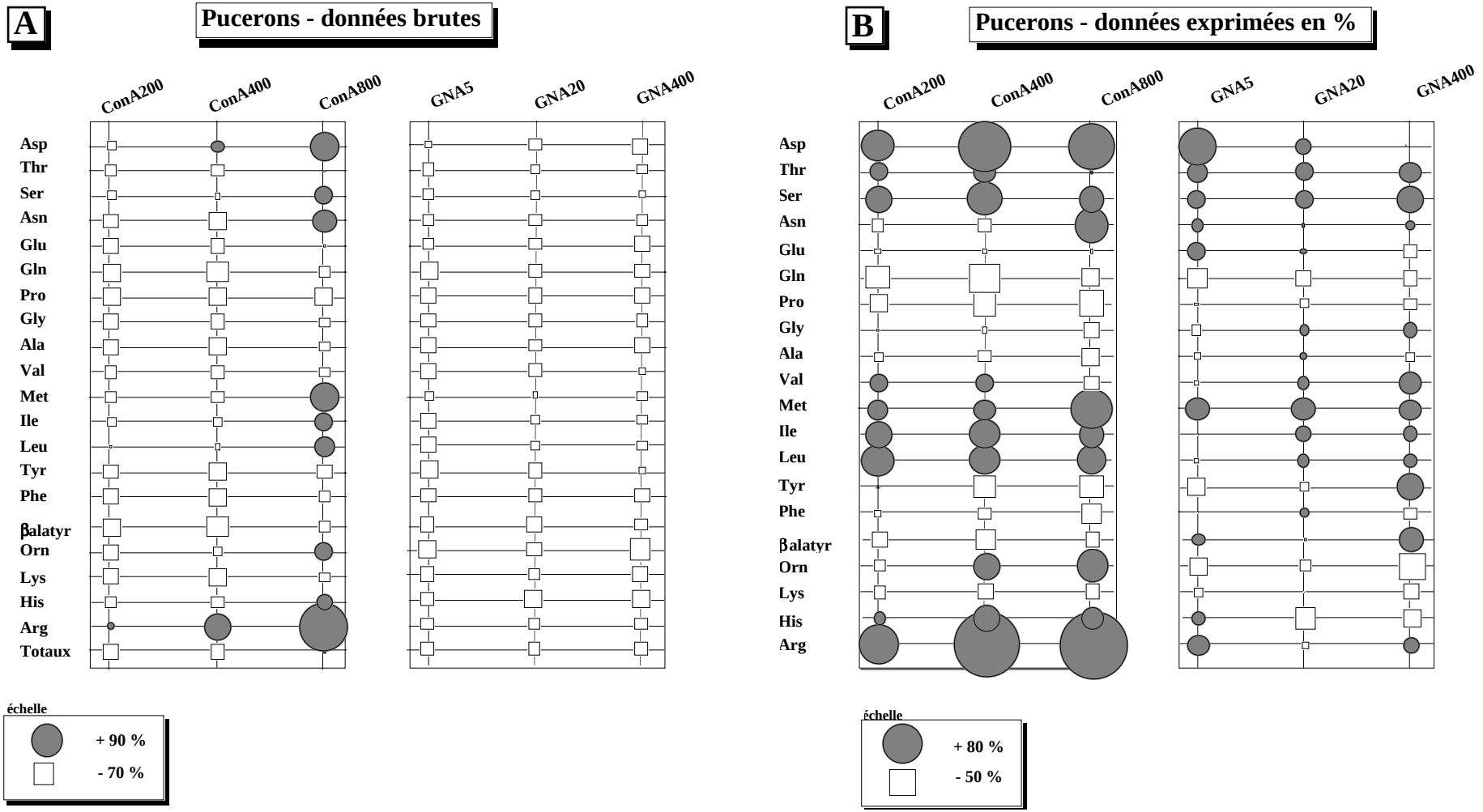


Figure 47 - Représentation schématique et synthétique des résultats du dosage par chromatographie des acides aminés libres de broyats de pucerons laissés 48 h sur des milieux Ap2 contenant de la ConA ou de la GNA. Valeurs dosées pour chaque acide aminé rapportées à la valeur des témoins : tableau A, données brutes ; tableau B, données relatives (rapportées aux acides aminés totaux)

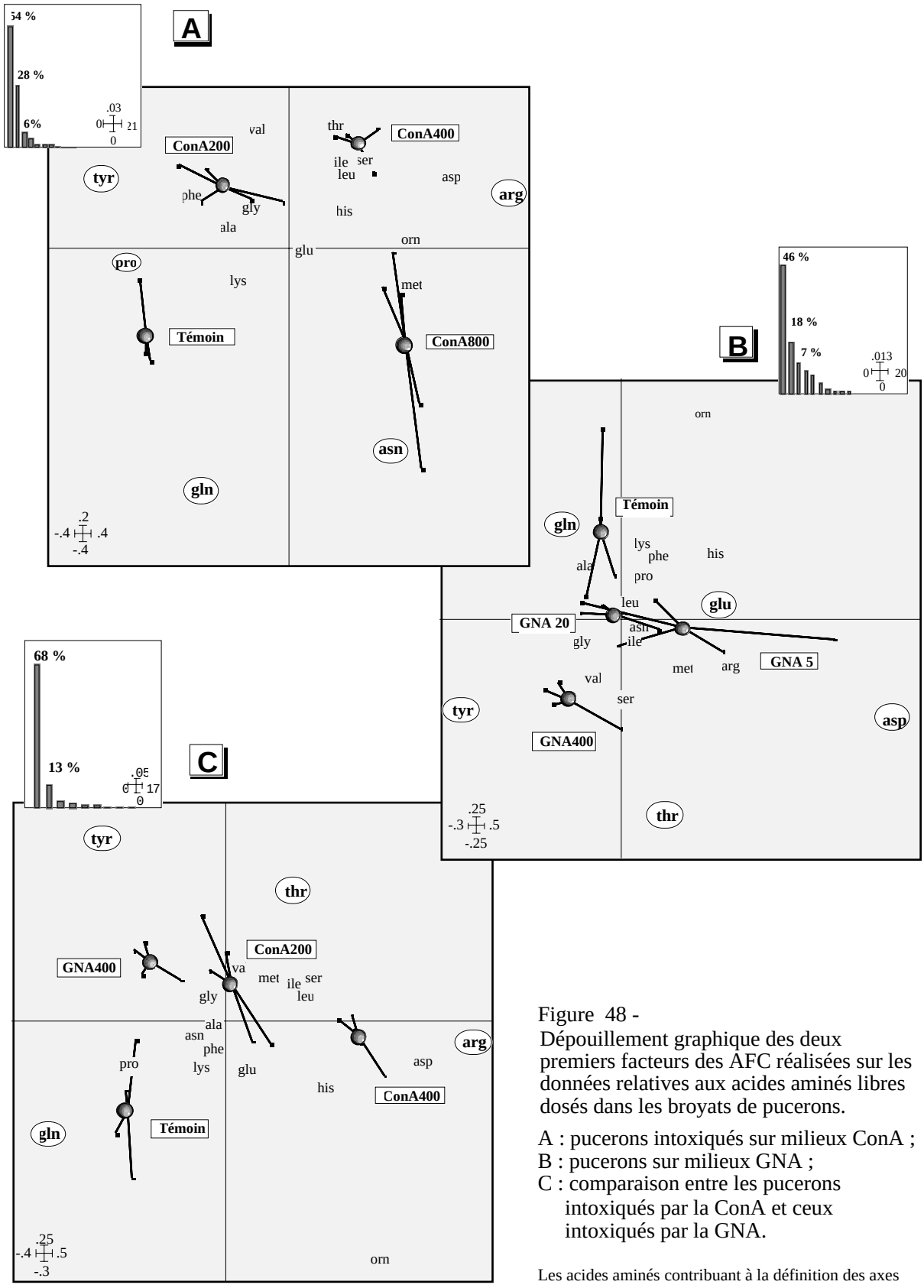


Figure 48 -
Dépouillement graphique des deux premiers facteurs des AFC réalisées sur les données relatives aux acides aminés libres dosés dans les broyats de pucerons.

A : pucerons intoxiqués sur milieux ConA ;
B : pucerons sur milieux GNA ;
C : comparaison entre les pucerons intoxiqués par la ConA et ceux intoxiqués par la GNA.

Les acides aminés contribuant à la définition des axes sont représentés en caractères gras et entourés.

est de plus très différent des autres modalités. En particulier, le taux d'arginine est multiplié par 3,3, celui de l'aspartate et de la méthionine par 1,9 et celui de l'aspargine par 1,6.

La figure 47A ne permet pas de rendre compte clairement d'éventuelles différences entre les profils ConA200 ou ConA400 et GNA. C'est ce qui explique que nous ayons transformé les données pour obtenir la figure 47B. Les profils des pucerons ayant ingéré de la ConA diffèrent totalement des profils des pucerons placés sur milieux GNA.

Pour condenser l'information contenue dans cette figure, trois analyses factorielles des correspondances (AFC) sont conduites (figure 48): la première (A) porte uniquement sur les dosages des modalités ConA (AFC-ConA) ; la seconde (B) prend en compte les dosages des modalités GNA (AFC-GNA) ; dans la troisième (C) les profils en acides aminés libres des pucerons intoxiqués par la ConA à 200 et 400 $\mu g.ml^{-1}$ et par la GNA à 400 $\mu g.ml^{-1}$ sont comparés (AFC-ConA/GNA).

Certes, trois AFC sont conduites séparément alors que nous raisonnons sur les données d'une même expérience, mais chacune des cartes factorielles permet ainsi d'illustrer sans confusion les réponses aux trois questions que nous nous sommes posées en introduction de cette expérience sur l'aminoacidémie.

Les deux premiers facteurs de l'AFC-ConA représentent 82 % de l'inertie totale. La statistique d'inertie (données non montrées) révèle que l'axe 1 discrimine surtout les pucerons témoins des insectes fortement intoxiqués. Cet axe est principalement défini par l'**arginine** (36 %), la **tyrosine** (15 %), la **proline** (12 %) et l'**asparagine** (8,4 %). Les broyats témoins contiennent en effet 3 à 1,5 fois moins d'arginine et d'asparagine, et 1,6 fois plus de tyrosine ou de proline (figure 47). Deux extraits de la modalité ConA800 contribuent à définir principalement (40 %) l'axe 2 (points excentrés sur la figure 48A). L'asparagine contribue pour 42 % à la définition de cet axe et la glutamine y contribue pour 28 %. Ces acides aminés marquent une différence entre les modalités ConA400 et ConA800 (ainsi qu'une importante variabilité intra de la modalité ConA800).

Il est intéressant de constater sur la figure 48B la discrimination entre la modalité témoin et les modalités GNA5 et GNA20. Les résultats obtenus avec la GNA400 sont moins surprenants. Près de 60 % de l'information portée par l'axe 1 provient d'un extrait GNA5 (point excentré). Cet axe permet cependant de discriminer la modalité GNA400 de la modalité GNA5. Rappelons que la première de ces modalités correspond à des broyats de pucerons fortement intoxiqués, la seconde à des broyats de pucerons dont la croissance a été au contraire stimulée. Cette discrimination est liée à la t**yrosine** (contribution absolue 33 %), à l'**acide glutamique** (20 %) et à l'**acide aspartique** (15 %). La figure 47B permet de comparer les quantités relatives de l'un et l'autre de ces acides aminés. La **thréonine** et dans une moindre mesure la **glutamine** (elles contribuent respectivement pour 37 % et 12 % à la définition de l'axe 2) permettent une discrimination témoin/GNA. L'ornithine bien qu'excentrée ne contribue pas à la définition de l'axe 2 et ne doit pas être prise en compte.

L'AFC-ConA/GNA (figure 48C) nous amène à souligner deux points :

-1) l'**intoxication par la ConA** se manifeste par une **modification graduelle** (en fonction de la concentration en lectine) du profil des acides aminés libres des pucerons ;

-2) les intoxications par la ConA et la GNA induisent des modifications significativement différentes des profils de ces acides aminés libres (annexes 12A & 12B). Cette différence est liée principalement à l'**arginine** et à la **glutamine**. Elles contribuent respectivement pour 43 % et 18 % à la définition de l'axe 1, qui discrimine parfaitement les modalités ConA400 et GNA400. La discrimination entre les modalités ConA200 et GNA400 paraît moins tranchée sur la carte factorielle. Mais la figure 47B confirme que les broyats de pucerons intoxiqués par la ConA200 contiennent plus d'arginine (x 1,6) et inversement moins de glutamine (: 1,6) que les broyats de pucerons intoxiqués par la GNA. Au niveau de l'aminoacidémie, il y a donc bien distinction entre les intoxications par les deux lectines à mannose.

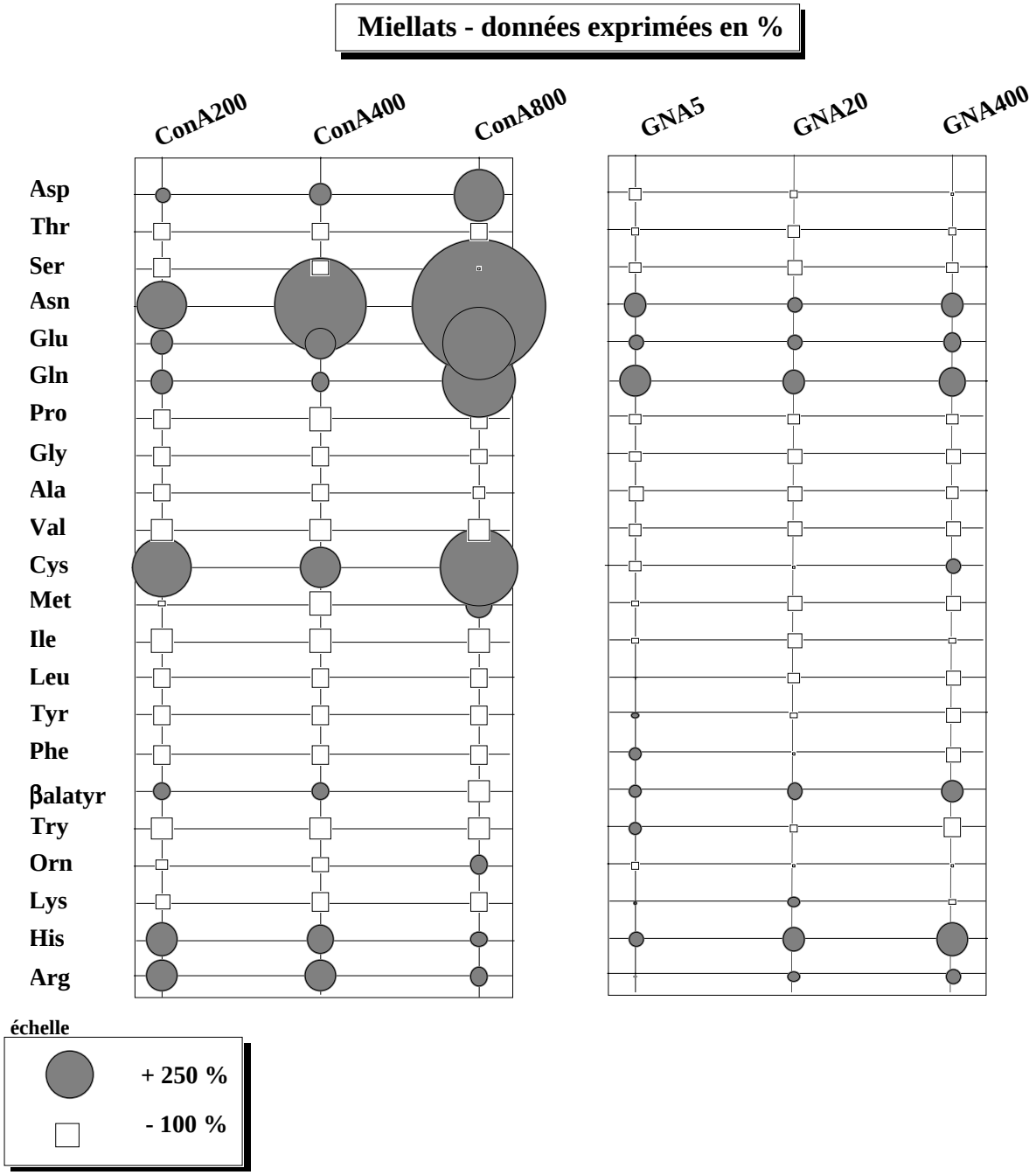


Figure 49 - Représentation schématique et synthétique des résultats du dosage par chromatographie des acides aminés libres de miellats de pucerons laissés 48 h sur des milieux Ap2 contenant de la ConA ou de la GNA. Valeurs dosées pour chaque acide aminé rapportées à la valeur des témoins : tableau de données relatives (rapportées aux acides aminés totaux).

3.2.2.2. Dosage des acides aminés libres des miellats

Des dosages sont également effectués sur les miellats excrétés par les pucerons dont nous venons de décrire les profils en acides aminés libres. Seules les données relatives (rapportées à la quantité totale d'acides aminés dosées) sont prises en compte dans les figures 49 et 50. Nous avons essayé de quantifier les valeurs de miellats excrétés (en poids frais, puis en poids secs). Mais cette quantification s'est avérée très imprécise notamment pour les miellats des modalités ConA400 et ConA800, du fait des très faibles quantités récoltées. C'est ce qui explique que nous ayons choisi de porter notre attention sur les profils.

Les **miellats** des pucerons sur milieux **GNA** ne présentent pas de différences majeures avec les miellats de la modalité témoin : trois acides aminés contribuent néanmoins à les discriminer : l'**arginine**, la **leucine**, la **glycine** (figure 50B). La phénylalanine et la lysine semblent marquer une différence entre les miellats témoins et les miellats GNA5 ou GNA20 (contributions respectives à la définition de l'axe 2, 26 % et 22 %). Le "composé" que nous appelons "Y" a un temps de rétention correspondant à celui de β-alanine-tyrosine, mais il est en fait la composante des trois pics pour la modalité témoin et de deux pics pour les modalités ConA200 et ConA400. Le dosage est moins précis pour la modalité ConA800. Les miellats GNA se distinguent par contre des miellats témoins par leur pic unique. Bien que paraissant minime cette différence ne doit pas être négligée si l'on s'intéresse par la suite à la distinction des deux intoxications (annexe 12C).

Le profil des acides aminés libres des **miellats** des pucerons intoxiqués par la **ConA** se différencie fortement de ceux des pucerons témoins ; en particulier le taux d'**asparagine** est multiplié par 21 dans les extraits ConA800. L'**acide glutamique**, la **glutamine** et la "**cystine**" quasiment absents dans les miellats des pucerons témoins, sont trouvés en plus forte quantité dans les miellats des pucerons intoxiqués. Il apparaît distinctement sur les figures 49 et 50A, que l'augmentation du degré d'intoxication se traduit par une augmentation de l'excrétion de l'asparagine principalement, mais aussi de la glutamine, de l'acide glutamique. Les anomalies d'"excrétion"[92] de la "cystine" (non prise en compte dans l'AFC, voir annexe 12C), et dans une moindre mesure de l'histidine et de l'arginine apparaissent quant à elles déjà lors de l'intoxication moyenne (200 $\mu g.ml^{-1}$).

La carte factorielle de la figure 50C montre une différence entre le pucerons intoxiqués par la ConA et ceux intoxiqués par la GNA au niveau des acides aminés excrétés : arginine (30 %) et lysine (16 %) expliquent l'essentiel de cette discrimination (ConA *vs* GNA). L'asparagine n'est pas prise en compte dans l'analyse "AFC ConA/GNA miellat" pour ne pas masquer l'information apportée par les autres acides aminés.

---

92 ici, ce terme d'excrétion est compris dans une acception générale (bilan excrétion/assimilation), qui ne présage forcément pas de phénomènes affectant la fonction physiologique d'excrétion *sensu stricto*.

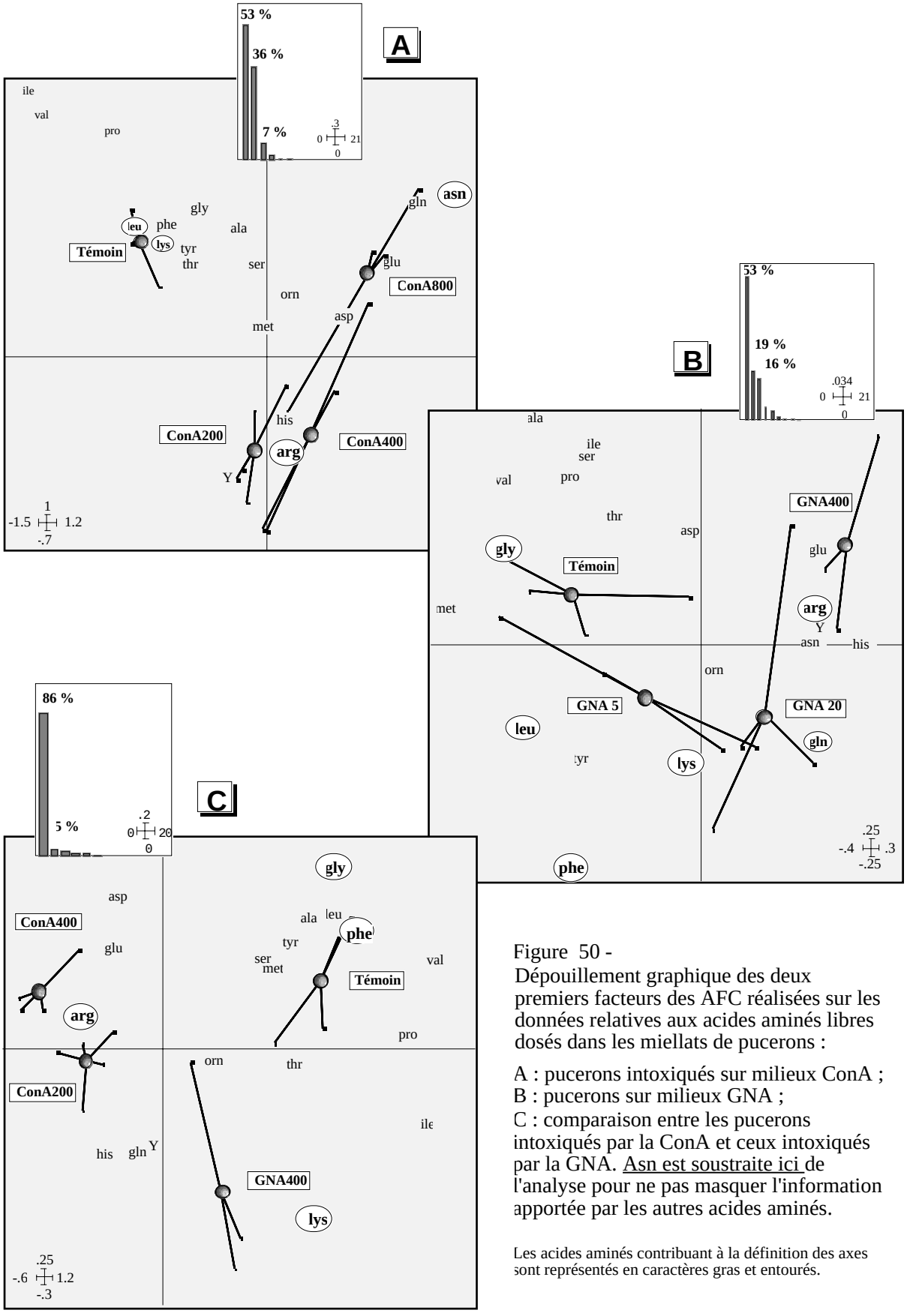


Figure 50 - Dépouillement graphique des deux premiers facteurs des AFC réalisées sur les données relatives aux acides aminés libres dosés dans les miellats de pucerons :

A : pucerons intoxiqués sur milieux ConA ;
B : pucerons sur milieux GNA ;
C : comparaison entre les pucerons intoxiqués par la ConA et ceux intoxiqués par la GNA. Asn est soustraite ici de l'analyse pour ne pas masquer l'information apportée par les autres acides aminés.

Les acides aminés contribuant à la définition des axes sont représentés en caractères gras et entourés.

3.3. Informations complémentaires sur le mode d'action de la Con A

Quatre derniers résultats ou interprétations nous apportent des informations qui nous semblent importantes pour la compréhension du mode d'action cellulaire de la Concanavaline A, ainsi que sur la différenciation de ces modes d'action au sein des lectines à mannose.

3.3.1. Stimulation de croissance induite par la GNA et la NPA - Comparaison avec la Con A

Nous avons déjà souligné (figure 13) que les lectines à mannose strict GNA, NPA et ASA induisent des stimulations de la croissance du puceron du pêcher *M. persicae* à la concentration de 10 µg.ml^{-1}. La Concanavaline A (lectine à glucose/mannose) est au contraire toxique dès la concentration de 15 µg.ml^{-1} (figure 13). Sur la figure 10, la toxicité de la GNA[93] vis-à-vis d'*A. pisum* se manifeste à faible dose.

L'expérience d'ingestion de très faibles concentrations de GNA[94] et de ConA a donc été reconduite avec *A. pisum* pour tester spécifiquemant cet effet "probiotique" déjà signalé :

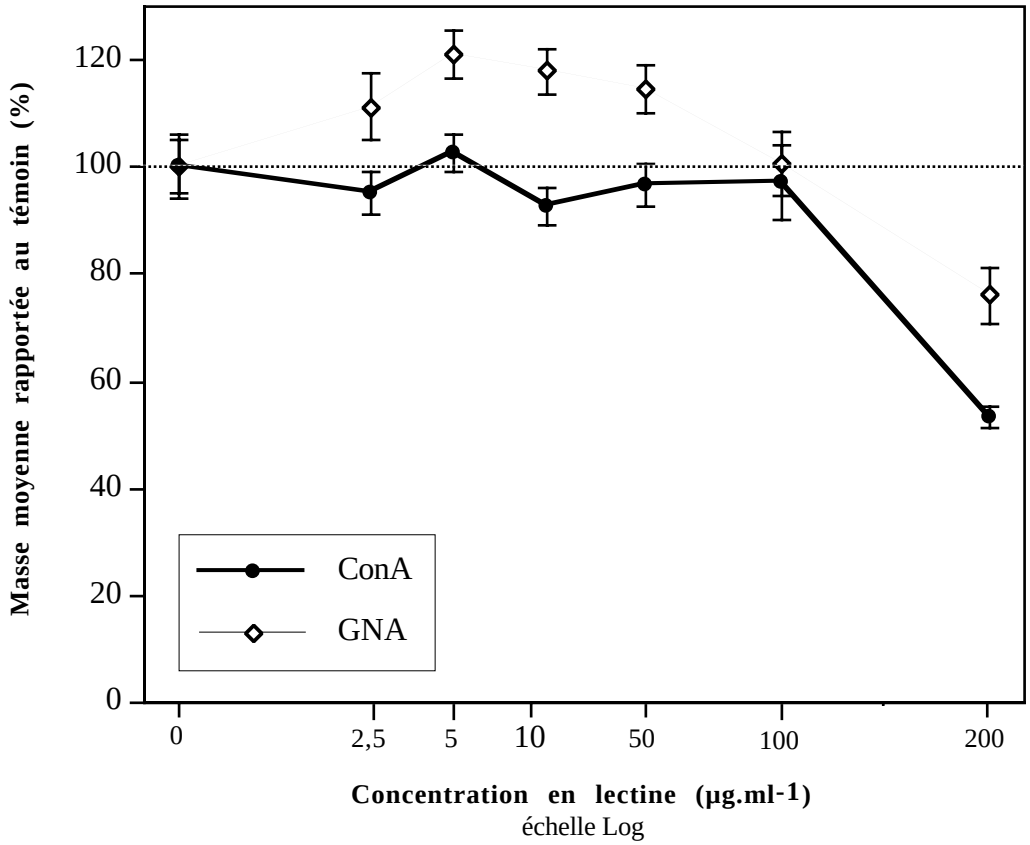


Figure 51 - Comparaison des effets de la ConA et de la GNA à faibles concentrations sur la croisance du puceron du pois Acyrthosiphon pisum.

La ConA ne s'avère ici significativement toxique qu'à partir de la concentration 200 µg.ml^{-1}. Ce résultat peut sembler contradictoire avec nos conclusions antérieures (figure 10, IC20 ≈ 3 µg.ml^{-1}), mais nous avons déjà souligné la variabilité des degrés d'intoxication

93 Lectine purifiée par Peumans et Van Damme (Université de Leuven, Belgique).

94 Lectine provenant de chez Sigma

observés avec cette lectine sur *A. pisum*. Néanmoins, les courbes de croissance de la Con A et de la GNA à très faibles doses diffèrent. Nous pouvons conclure en effet que la **GNA induit une stimulation de croissance significative** des larves d'*A. pisum* aux concentrations comprises entre 5 et 50 µg.ml^{-1}. Cette expérience confirme donc clairement ce qui avait été observé avec *M. persicae*, à savoir l'existence d'un effet "probiotique" (*i.e.* stimulant sur le paramètre croissance larvaire) par la GNA (et vraisemblablement pour toutes les lectines à mannose strict), contrairement à ce qui est observé pour la Concanavaline A.

3.3.2. Expression des concentrations de lectines testées en nombre de molécule (mole) par ml.

Les figures 52A et B reprennent les résultats des tests d'intoxication aiguë (chapitre 2) en exprimant les concentrations en µM et non plus en µg.ml^{-1}, pour comparer les interactions en nombre de molécules et non plus en masse :

Il aurait été intéressant de pouvoir ausssi exprimer les concentrations en nombre de sites de liaison aux sucres, pour mettre en évidence une éventuelle corrélation entre ce nombre et le degré d'intoxication. Mais nous ne connaissons pasle nombre de sites de liaison aux sucres de la GNA et de la NPA, et nous ne pouvons donc pas comparer les effets toxiques des trois lectines sur la base de ce critère.

La Concanavaline A est une protéine tétramérique de 106 kDa (chapitre 1). Sur *A. pisum*, nous estimons, de façon assez imprécise, l'IC20 à 0,03 µM et l'IC50 à 0,47 µM. Pour la GNA (tétramère, 50 kDa), ces paramètres sont estimés respectivement à 0,2 et 3,5 µM. En ce sens, elle paraît donc beaucoup moins toxique pour le puceron du pois.

M. persicae est moins sensible à ces deux lectines, ainsi qu'à la NPA (figure 52B). C'est ce que nous montre aussi la figure 13. Les IC20 molaires pour la ConA, la GNA et la NPA sont respectivement de 0,09 µM, 2,8 µM, 4,8 µM ; les IC50 de 7,31 µM, 12,6 µM et 22,6 µM.

La ConA apparaît donc plus toxique que la GNA ou la NPA pour les deux pucerons testés. Le fait le plus marquant est surtout que la ConA et les deux lectines à mannose strict présentent des courbes dose/réponse très différentes avec des activités différentes à faibles doses. La ConA est active dès les faibles doses (encore que nous observons une certaine variabilité de la réponse des pucerons à l'intoxication à ces concentrations), puis dans une gamme moyenne l'IC est stable (≈ 50 %), et à forte dose elle est très toxique. La GNA et la NPA présentent un seuil d'intoxication à partir des doses moyennes. Ceci suggérerait des mécanismes d'action différents. Mais il serait prématuré d'avancer des hypothèses plus précises.

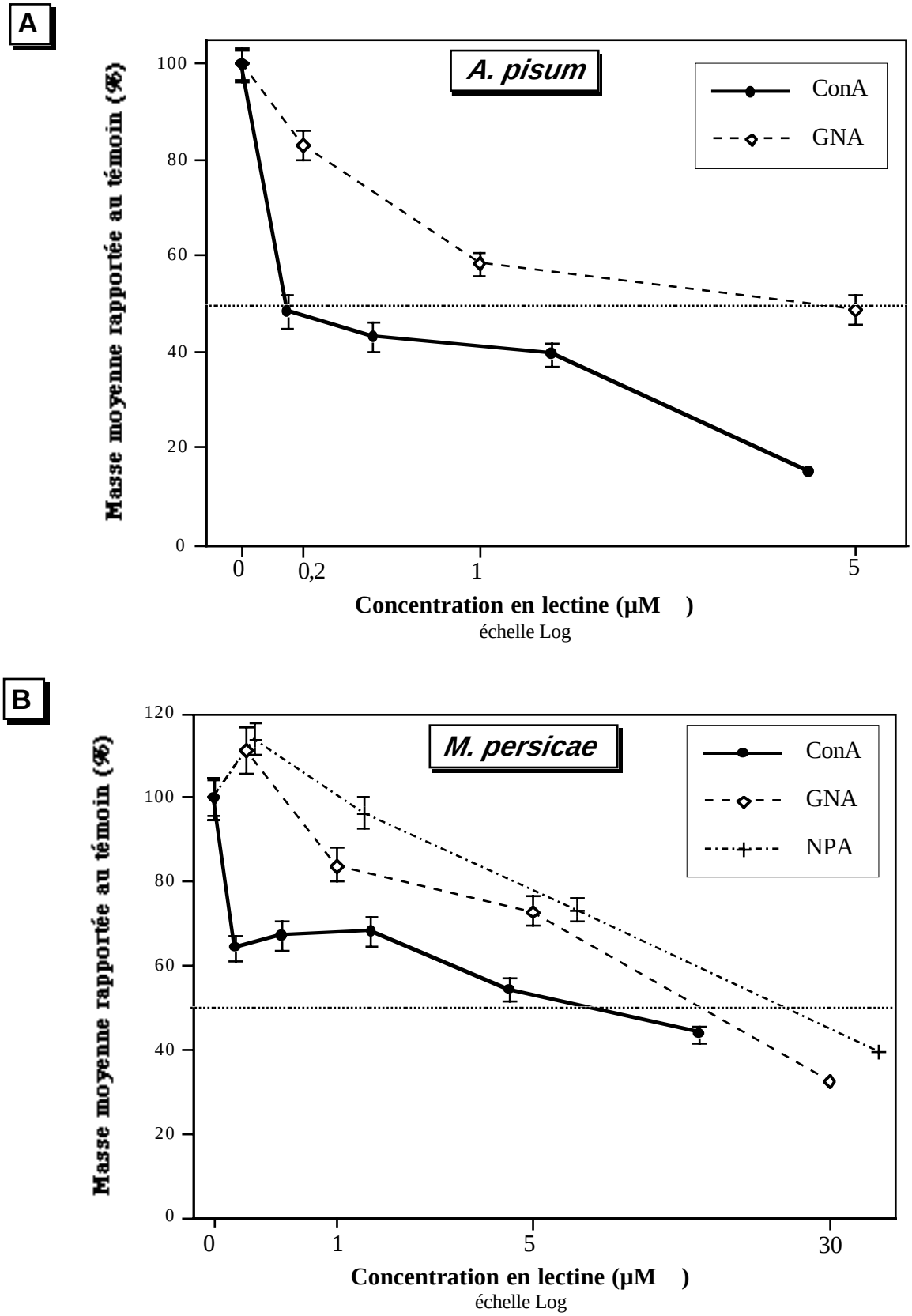


Figure 52 - Comparaison des effets de lectines à mannose/glucose sur la croissance (A) du puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum* ; (B) du puceron du pêcher, *Myzus persicae*. Concentrations inhibitrices exprimées en moles/ml de milieu.

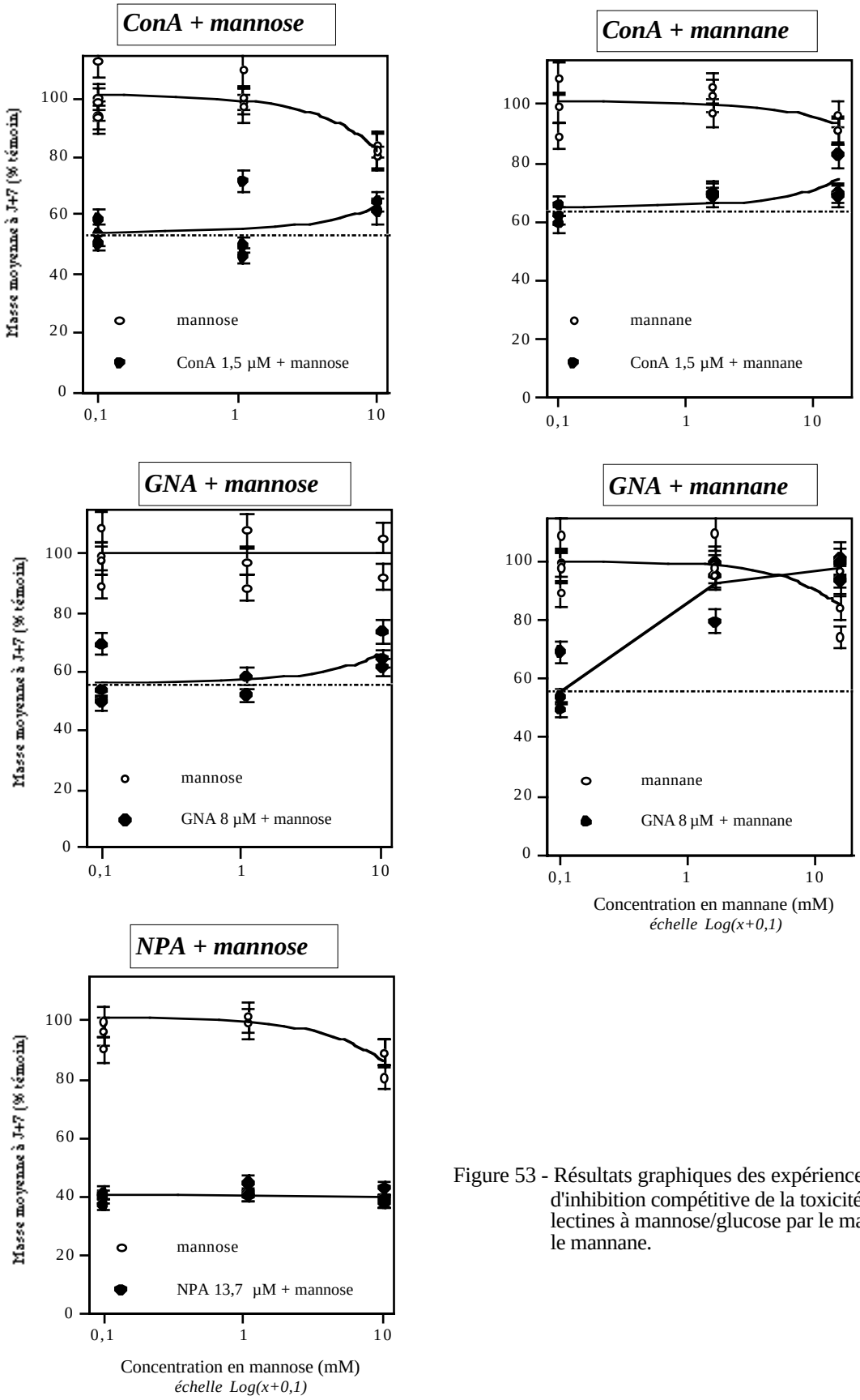


Figure 53 - Résultats graphiques des expériences d'inhibition compétitive de la toxicité de trois lectines à mannose/glucose par le mannose et le mannane.

3.3.3. Expériences d'inhibition compétitive de la toxicité par des mannosides

3.3.3.1. Expérience *in vivo*

De nombreuses études toxicologiques chez le rat (introduction de ce chapitre) montrent qu'en incorporant dans un aliment contenant de la ConA un sucre approprié (mannane, α-méthyl-mannoside, mannose) il est possible d'obtenir une inhibition partielle ou totale des effets toxiques de la lectine. Conformément à la définition des lectines, ces expériences démontrent que la ConA agit bien comme une lectine, c'est à dire en interagissant avec des sucres (vraisemblablement des résidus mannosides de récepteurs membranaires) selon la réaction :

$$\text{lectine} + \text{sucre} \rightleftharpoons \text{lectine-sucre}$$

Les anglo-saxons désignent cette réaction par le terme "lectinic reaction". Le sucre ajouté en excès dans l'aliment déplace l'équilibre en libérant des lectines complexées et en abaissant donc la dose active de lectine.

Nous avons repris cette démarche qui consiste à rajouter un sucre approprié pour inhiber l'action de la lectine, en utilisant trois sucres auxquels la ConA se lient de manière très affine : le mannose, l'α-methyl-mannoside (αMM) et le mannane[95] (par ordre croissant d'affinité pour la ConA, Poretz et Goldstein, 1986).

Des larves sont laissées le temps de leur développement larvaire sur des milieux contenant de la ConA, de la GNA ou de la NPA à des concentrations choisies pour inhiber leur croissance d'environ 50 % en 7 jours (respectivement 160 $\mu g.ml^{-1}$ soit 1,5 µM ; 400 $\mu g.ml^{-1}$, 8 µM et 500 $\mu g.ml^{-1}$, 13 µM). A ces solutions nous avons rajouté l'un des sucres cités précédemment aux concentrations de 1 mM ou 10 mM (figure 53).

Les résultats obtenus avec l' αMM sont difficilement interprétables, car cette molécule même à faible dose s'avère phagorépulsive pour les pucerons. La figure 53 montre que le mannose et le mannane à forte concentration induisent également une inhibition de la croissance. Le rapport molaire maximum sucre/lectine que nous pouvons tester est donc de l'ordre de 1/10000.

En rajoutant 10 mM de mannose au milieu contenant 1,5 µM de ConA (rapport 1/6700) nous obtenons une très faible (mais significative $p<5$ %, ANOVA) inhibition de l'intoxication ($IC \approx 65$ % *vs* 55 %, figure 53A). Le résultat avec la GNA est identique (figure 53C). La toxicité de la NPA n'est pas affectée par le mannose (figure 53C). En ce qui concerne le mannane, l'ajout de ce polyoside ne s'accompagne pas d'une atténuation de l'inhibition de croissance induite par la Con A (figure 53D). Par contre, ce sucre semble inhiber complètement la toxicité de la GNA (figure 53E).

Ces résultats nous amènent à plusieurs réflexions :

-1) d'une façon générale, les doses de ligands compétitifs utilisées nous semblent assez élevées et nous observons par exemple avec le mannose, soit une absence totale de compétition (1 mM), soit une faible levée de l'inhibition à la dose la plus élevée (pour ConA et GNA et des rapports sucre-lectine de plus de 5000). Nous pouvons interpréter cela soit comme un indice de l'existence d'une interaction toxique de nature non-lectinique, soit comme l'indice d'une très forte affinité lectine/cible physiologique, incapable d'être déplacée même par de très forts excès de ligands libres.

---

95 le mannane est un polyoside dérivé du mannose, en l'occurence dans nos expériences, isolé d'une bactérie, *Saccharomyces cerevisiae*. Il est utilisé aux concentrations de 250 $\mu g.ml^{-1}$ et 2500 $\mu g.ml^{-1}$. Sur l'axe des abcisses de la figure 53D nous exprimons ces concentrations en équivalent molaire de molécules de mannose (mannose moins une molécule d'eau).

-2) l'autre point important est la réaction très différente de la ConA et de la GNA vis-à-vis du ligand polyosidique (mannane). L'incapacité de ce dernier à lever la toxicité de la ConA nous ramène au point précédent, suggérant un rapport de compétition cible/mannane très favorable à la cible, soit en affinité spécifique (mais nous ne connaissons pas le Km ConA/mannane), soit éventuellement aussi en densité de sites. Ce point nous semble plausible au vu des capacités très importantes de liaison de la ConA à l'intestin d'*A. pisum* .

-3) pour ce qui est de la GNA, la situation diffère donc sensiblement, car l'inhibition est levée dès le rapport molaire mannane/lectine de 8/1000, suggérant soit une affinité lectine/cible moins forte, soit une interaction lectine/mannane différente de celle induite par la ConA. Il faut en effet garder à l'esprit que la présence d'un ligand efficace peut aboutir à une séquestration de lectine, par précipitation par exemple (Shibuya *et al.*, 1988a), l'empêchant par la suite d'interagir avec sa cible. Les pucerons sont en principe très sensibles à la présence de précipités dans leur alimentation, et nous n'avons pas observé d'anomalie biologique témoignant de cela dans nos tests[96]. Ce n'est cependant pas une interprétation que nous pouvons exclure *a priori*.

3.3.3.2. Expérience d'inhibition *in vitro* sur coupes histologiques

Sur les conseils du Dr A. Pusztai, des coupes de larves intoxiquées par la Con A sont incubées pendant 2 h dans une solution de TBS contenant 10 $\mu g.ml^{-1}$ d'α-méthyl-mannoside, puis immunomarquées.

Quelles que soient les coupes (modalités ConA200, 400 ou 800) la couleur marron caractéristique de la lectine ne semble pas affectée par ce traitement (données non montrées). Les molécules de ConA ne semblent pas s'être décomplexées de leurs éventuels "récepteurs". Mais la technique de dosage utilisée (amplification avidine-biotine) est très sensible et non quantitative. Or, les dosages ELISA précédents ont montré que l'estomac fixe de très grandes quantités de lectine. Il est possible que de la ConA ait été en partie déplacée mais que les quantités restant fixées fussent suffisantes pour que la couleur des coupes marquées paraisse inchangée.

Nous n'avons pas eu le temps de recommencer cette expérience en faisant varier les durées d'incubation ou/et les concentrations en sucre. Ces résultats incomplets ne répondent donc pas de façon univoque à notre question initiale qui était de savoir si la Concanavaline A agit ou non strictement par ses sites lectiniques.

---

96 Cela se traduit par des mortalités précoces et une variabilité individuelle importante dans les tests (Duport et Rahbé, communication personnelle).

4. Discussion

L'ingestion de la Concanavaline A par des larves d'*A. pisum* est suivie en 48 h par l'apparition d'importantes **lésions au niveau de l'estomac**. Les dégâts ont une amplitude plus ou moins grande suivant les concentrations de lectine ingérées, mais se traduisent toujours par une gonflement cellulaire, une hypersécrétion, un détachement progressif de la membrane apicale (exfoliation), une accumulation importante dans la lumière stomacale de débris membranaires et de matériels cytoplasmiques. Il ne semble pas que la bordure striée soit elle-même directement atteinte. Il n'y a pas lyse de l'épithélium. Les cellules épithéliales ne perdent pas leur intégrité, en particulier leur noyau ne semble pas détruit. Les lésions que nous observons sont similaires sur plusieurs points avec celles décrites chez le rat.

Une étude plus détaillée sur l'ultrastructure de la bordure striée nous permettrait de confirmer ou d'infirmer cette analogie. Lorenzsonn *et al.* (1982) observent localement une destruction des microvillosités et l'apparition de vésicules entre ces microvillosités. Les coupes que nous avons observées en microscopie électronique ne sont malheureusement pas assez résolutives[97] pour permettre la distinction de ces symptômes.

Nos observations ne permettent pas de montrer si des lésions apparaissent dans l'intestin des larves très fortement intoxiquées. Mais nous avons néanmoins montré que cette région du mésentéron serait capable de fixer, comme l'estomac, de grandes quantités de lectine (*in vitro*, mais semble-t'il aussi *in vivo*).

Les résultats d'études sur le mode d'action de la ConA sur l'épithélium de rat indiquent que la lectine agirait en se liant à un récepteur de type glycoprotéine membranaire du fait de sa spécificité osidique. Nos expériences d'inhibition compétitive de la toxicité de la ConA par un sucre approprié ne permettent pas de confirmer clairement cette interprétation. Les résultats obtenus avec la GNA et la NPA nous indiquent cependant que nous ne nous sommes pas placés dans les conditions expérimentales idéales pour observer l'inhibition attendue de la toxicité (concentrations plus fortes en sucre ?[98]). Il est en effet assez étonnant que ces lectines à mannose strict n'interagissent pas avec le mannose ajouté. Cette observation pourrait cependant s'expliquer par une **très forte affinité des lectines pour leurs récepteurs physiologiques**, éventuellement suivie par une séquestration physique (internalisation par exemple) les soustrayant à l'équilibre compétitif avec le ligand libre.

Un immunomarquage sur coupes de larves ayant ingéré du milieu contenant la ConA plus un sucre approprié devraient apporter des éléments d'observations supplémentaires. L'expérience d'inhibition sur coupes devra être également reconduite avant que nous ne remettions éventuellement en cause notre hypothèse de travail.

L'intoxication cellulaire par de la Con A est par contre indiscutable. Nous pouvons nous demander s'il existe une **relation entre les fonctions de cellules mésentériques et leur sensibilité à la toxine**. Ces cellules à la fois sécrétrices et absorbantes offrent des différences d'une région à l'autre qui reflètent des rôles physiologiques diversifiés : sécrétion (enzymes digestives, substances diverses), absorption, excrétion, régulation osmotique.

Ponsen (1972, 1987) considère que l'**estomac** est le siège de nombreuses **sécrétions.** L'observation chez *M. persicae* de produits de sécrétion et de fragments cellulaires, en particulier au niveau de l'estomac antérieur, confirme cette interprétation. Nos observations sur *A. pisum* appuient ces faits.

Dans la région de l'**intestin**, les cellules de sécrétion sont absentes. La fonction essentielle des cellules de cette région serait l'**absorption** (Weber, 1928 ; Bramstedt, 1948 ; Mackauer, 1959 cités par Ponsen, 1972). Ponsen justifie cette hypothèse en faisant observer que les cellules intestinales offrent une grande surface luminale et une bordure striée bien développée (planche V). De plus, il remarque que le matériel présent dans la lumière stomacale ne se distingue plus dans la lumière intestinale. Par dissection, les éléments de l'estomac sont

---

97 Pour des raisons techniques de fixation que nous espérons résoudre bientôt.

98 Mais la concentration 2500 µg.ml^{-1} est cependant la concentration la plus forte acceptée par les pucerons.

flocculents, alors que dans l'intestin et le stomodeum il ne retrouve qu'un liquide clair et fluide. Nous observons aussi de telles différences chez **A. pisum**.

Forbes (1964) attribue la fonction d'**excrétion** au stomodeum (**rectum**). Nous avons constaté chez *A. pisum* que cette partie du mésentéron est très développée (figure 43). Il nous paraît probable que cette "poche" très dilatée joue un rôle dans l'osmorégulation pouvant être rapproché de celui de la "chambre filtrante" observée chez d'autres Homoptères. Nous pouvons rappeler que la régulation de la pression osmotique est un processus essentiel chez ces insectes qui ingèrent de grandes quantités de nourriture liquide, dont la concentration en solutés peut varier assez considérablement.

La fonction de sécrétion des cellules stomacales est à rapprocher du fait que les lésions observées débutent dans l'estomac et se traduisent par un acroissement très marqué de l'envahissement de la lumière par du matériel cytoplasmique et autres débris cellulaires. Mais l'i**ntoxication cellulaire ne se limite pas à ces simples sécrétions** puisque c'est l'ensemble de la membrane épithéliale qui semble être rejetée et remplacée.

La ConA agirait donc en induisant une stimulation de la fonction naturelle de remplacement de cette membrane :

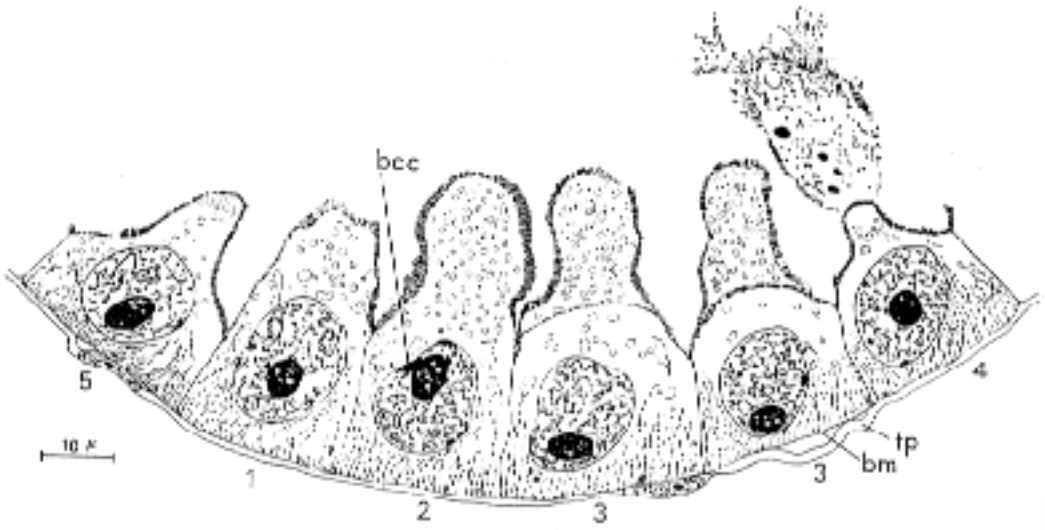


Figure 54 - Représentation schématique des différentes phases de sécrétion naturelle (1 à 4) d'une cellule épithéliale de l'estomac intermédiaire de Myzus persicae *(d'après Ponsen, 1972 & 1987). Les abréviations sont données en annexe 15.*

Les dommages pourraient aussi ne pas se limiter à l'estomac notamment aux fortes concentrations en toxine. Mais si nous savons que la lectine est capable de s'accumuler et de se fixer dans l'intestin, notre travail ne nous permet pas d'affirmer que l'ensemble du mésentéron est atteint.

L'**analyse des pools d'acides aminés libres** s'avère souvent assez **complexe**. En effet, cet outil diagnostic reflète un équilibre global (synthèses, catabolisme, excrétion, compartimentations...) dont il peut être difficile de distinguer des éléments directement interprétables. Lorsque cela est possible comme nous allons le tenter ici, il faut également garder à l'esprit que l'interprétation proposée, si cohérente soit-elle, peut ne pas être la seule possible, et donc ne représenter que partiellement la réalité.

Quoiqu'il en soit de l'interprétation physiologique sous-jacente, il ressort de cette expérience que les situations analysées peuvent être distinguées assez clairement par leurs profils d'acides aminés, tant au niveau des pools libres totaux que pour ceux présents dans les miellats excrétés. Ceci ressort de la distribution graphique des classes et des individus dans les figures 48 et 50, ou seules les modalités de l'effet probiotique de la GNA semblent difficiles à démêler (que ce soit dans les miellats -figure 50B- ou dans les libres totaux -figure 48B-). La **puissance de cet outil semble donc a priori satisfaisante**. Un autre point technique à souligner est la **reproductibilité des résultats** pour la situation témoin, en

comparaison avec ceux obtenus dans des conditions expérimentales différentes, toujours sur adultes de notre clone d'*A.pisum* élevé sur milieu Ap2, et publiées par ailleurs dans un autre contexte (Liadouze *et al.*, 1995). La fiabilité de cet outil souligne le **degré assez important de l'homéostasie de l'amino-acidémie** chez les pucerons munis de leur complément symbiotique (*id ibidum*).

Nous discuterons tout d'abord de l'intoxication aiguë par la ConA (comparaison des témoins et des trois doses de ConA), en commençant par l'analyse des résultats des miellats, car l'interprétation de ce compartiment d'excrétion est plus directe que celle de l'équilibre global en acides aminés libres. Nous pouvons cependant rappeler en introduction à toute cette interprétation, les structures et fonctions hypothétiques assignées à la portion du mésentéron qui est la cible principale de la ConA (*i.e.* l'estomac et en particulier sa fraction médiane). D'après Ponsen (1972) et comme nous venons de le rappeler, cette partie se caractérise par une activité cellulaire intense de sécrétion par un phénomène de constriction/exfoliation, avec abondance de granules basophiles ; par ailleurs, parmi les aminopeptidases détectées dans le tube digestif d'*A. pisum*, il semble que celles qui soient les plus liées à cette portion soient celles ayant une spécificité préférentielle pour l'arginine, la lysine, l'ornithine (tous acides aminés basiques et riches en azote et impliqués dans l'excrétion azotée), la glutamine et le tryptophane (eux aussi assez riches en azote) ou la ß-alanine et la méthionine. Une **double fonction sécrétoire et excrétoire paraît donc plausible pour cette région mésentérique**.

En ce qui concerne les **miellats** des pucerons intoxiqués à la **ConA**, le syndrome majeur est sans conteste l'**augmentation constante de l'excrétion d'asparagine** avec l'intoxication d'un composant mineur chez les témoins (1,3%). Il passe au second rang dès la deuxième dose pour finir à près de 28% chez les pucerons très fortement intoxiqués. C'est un syndrome de même ampleur que l'hyperexcrétion de glutamine chez les pucerons aposymbiotiques[99] (Sasaki et Ishikawa, 1993a ; Douglas, *in press*; Liadouze, non publié), mais probablement d'interprétation différente : la **glutamine** peut en effet être considérée comme un produit de **détoxication de l'ammoniaque**, qui s'accumulerait et serait excrété massivement en l'absence de recyclage par les symbiotes[100]. Une interprétation similaire de l'excrétion d'**asparagine** devrait s'accompagner de taux endogènes élevés de ce même acide aminé, ce qui n'est pas le cas aux doses moyennes de ConA (figure 47B).

Une autre interprétation de cet accroissement d'Asn dans les miellats peut invoquer une **perturbation de l'assimilation** de cet acide aminé. Asn est en effet l'acide aminé très largement majoritaire (>70%) de la sève des plantes hôtes principales de *A. pisum* (fève, pois, luzerne...), et un système de transport efficace doit être présent dans le tube digestif d'*A. pisum.* Si ce système est perturbé, il peut théoriquement en résulter une sous-assimilation de cet acide aminé et une augmentation de ses teneurs dans le miellat. Deux arguments militent un peu contre cette interprétation, qui sont d'une part la spécificité non absolue des systèmes de transport des acides aminés (Asn ne devrait pas être le seul à afficher ce comportement[101]), et d'autre part la portion mésentérique concernée ne semble pas celle spécialisée dans les phénomènes d'absorption[102].

Enfin, une dernière hypothèse peut être évoquée, qui est la **stimulation de la transformation/excrétion d'asparagine** à partir d'un **précurseur** immédiat (Asp ou Gln)[103]. Il est difficile de trancher avec les seuls éléments dont nous disposons, mais il paraît certain qu'un système de transport de cet acide aminé au travers de l'épithélium intestinal est profondément perturbé.

---

99 C'est-à-dire débarrassés de leurs symbiotes.

100 qui sont un puits majeur à Glu/Gln chez *A.pisum* (Febvay *et al.*, 1995).

101 Il est vrai que Asp, Glu et Gln montrent des accumulations relatives analogues à Asn, mais seulement à très forte dose.

102 Caractérisés par des bordures striées très développées, du type de celles observées plus en aval dans l'intestin ; mais là encore, il peut y avoir des spécialisations différentielles d'absorption des acides aminés le long du tractus digestif.

103 Une synthèse et excrétion d'Asn dans le miellat, à partir de Gln marquée ingérée, a par exemple été signalée chez les pucerons aposymbiotiques par Sasaki *et al.* (1993b).

Le deuxième élément du "syndrome d'intoxication par la ConA" en ce qui concerne le miellat est l'**hypersécrétion d'Arginine** (passage de 25% à 50% des acides aminés du miellat suite à l'intoxication). Ici, contrairement à Asn, cela s'accompagne d'une nette perturbation globale du métabolisme de cet acide aminé : c'est en effet le seul acide aminé s'accumulant progressivement dans les pools libres totaux au cours de l'intoxication (figure 48A et B). La **ConA semble donc stimuler**, directement ou indirectement, **les voies d'excrétion** du puceron (notamment celles de l'arginine au détriment d'une éventuelle voie de la lysine[104]) ; cette observation s'accorde bien avec la localisation histologique des effets de la ConA au niveau de l'estomac moyen, siège des activités aminopeptidases basiques signalées un peu plus haut.

Le troisième élément, éventuellement quantitativement mineur, concerne l'apparition d'une excrétion d'un **composé ninhydrine positif** (identifié par X ou " cystine " pour signaler son temps de rétention similaire à l'aminoacide soufré[105]) ; sa teneur relative dans le miellat augmente de 4 à 5 fois après intoxication, mais l'absence d'identification ne nous permet pas d'interpréter sa présence. Signalons cependant que certains dipeptides à amides (γ-glu-Gln ou γ-Glu-Asn) ont été identifiés par une équipe japonaise dans le miellat de pucerons aposymbiotiques. De tels composés, non identifiés dans nos chromatogrammes à la ninhydrine, pourraient plausiblement être détectés en accompagnement des perturbations citées du transport de l'Asn.

Enfin, le dernier élément concerne la **diminution** parfois très importante de nombreux **acides aminés indispensables dans les miellats** de pucerons intoxiqués (Try, Ile, Val, Leu, Tyr, Phe ; figure 49 et données chiffrées en annexe 12C). Ce fait peut être assez directement relié aux **pertes protéiques** liées à l'accélération très importante de l'**exfoliation de l'estomac** par la ConA, et observées tant en histologie que dans les électrophorèses de miellats. Ces pertes nécessitent le remplacement de matériel cellulaire (*e.g.* bordure striée, avec toutes ses enzymes et transporteurs), et donc une consommation accrue d'acides aminés essentiels. Ce symptôme de stress nutritionnel est souligné non seulement par l'accroissement d'assimilation entraînant des taux très faibles dans le miellat, mais également par une diminution assez générale de l'amino-acidémie, notamment de certains acides aminés indispensables, comme les aromatiques, et du couple Glu/Gln qui est le " fuel " symbiotique principal chez *A. pisum* (Febvay *et al.*, 1995).

Deux commentaires sur ce symptôme de stress nutritionnel :

-1) il est très différent de celui accompagnant l'aposymbiose (marquée elle par une élévation nette de l'amino-acidémie et de la glutaminémie), et ne traduit donc pas un " vague malaise " indifférencié, soulignant l'intérêt diagnostic de l'outil utilisé ;

- 2) si l'intoxication à la ConA s'accompagne d'une demande nutritionnelle forte, cela peut laisser prévoir une **interaction forte entre état nutritionnel et toxicité**, **accentuant la toxicité de la lectine dans des conditions moins favorables** que celles utilisées ici. Cette prédiction est très aisée à confirmer en milieu artificiel et devra être testée rapidement.

Un dernier point n'est pas apparu dans les analyses de miellat, mais ressort assez nettement de celles des pools libres totaux : comme pour les acides aminés aromatiques cités plus haut, les teneurs en **proline** sont constamment déprimées au cours de l'intoxication. Cela peut souligner soit un effet corrélé au phénomène d'**hyperexcrétion lié à l'arginine**[106], soit encore une corrélation avec les acides aminés aromatiques qui sont utilisés avec la proline par les insectes pour des besoins structuraux de développement, comme la synthèse des tissus conjonctifs et de la cuticule (Brey *et al.*, 1985).

---

104 deuxième acide aminé excrété quantitativement en situation témoin.

105 son rapport de coloration sur les deux canaux de l'autoanalyseur le distingue très clairement de la cystine.

106 une voie Pro -> Arg encore mal connue a été récemment mise en évidence au laboratoire par marquage radioactif (Liadouze, non publié; Febvay *et al.*, 1995).

Nous serons un peu plus bref sur l'interprétation de l'effet de la GNA, qui comprend aussi des données à faibles doses, où l'on observe clairement l'**effet probiotique**. Une analyse des miellats (figure 49, partie droite ; annexe 12C avec données chiffrées) montre que même à la plus forte dose utilisée (400µg.ml^{-1}), la GNA ne semble pas induire des sympômes aussi importants que la ConA. On observe bien la stimulation de l'excrétion d'arginine, mais ici l'effet semble plus marqué sur l'histidine, et un peu moins au détriment de la lysine que dans le cas de la ConA. Il y a donc bien **conservation de l'effet sur l'excrétion** (Arg/Orn/Pro d'un coté, et His de l'autre), mais dans des modalités légèrement différentes.

Par contre, l'effet de fuite de l'asparagine est très peu visible avec la GNA : nous observons simplement une très légère accumulation de Asn/Glu/Gln dans les miellats à haute dose de GNA. On observe également dans ces conditions une accumulation de composés ninhydrine positifs non identifiés dans les miellats, comme celui nommé X précédemment, mais surtout une famille de " peptides " variés entourant le pic de " ß-Ala Tyr ", que l'on ne distingue pas aussi nettement sur les chromatogrammes des traitements à la Concanavaline A (données non montrées). Il est difficile de fournir ici une interprétation claire caractérisant l'effet de la GNA, mais il semble bien cependant que l'on puisse distinguer les effets induits par cette lectine à dose toxique de ceux de la ConA (figure 48 et 50), laissant ici aussi supposer des **modes d'actions légèrement différents**.

Quant à l'effet probiotique de la GNA, il est encore plus délicat d'en délimiter les caractéristiques métaboliques (faiblement marquées) au delà d'une simple paraphrase des données : les miellats fournissent peu de renseignements à ce sujet, et les acides aminés libres totaux (figure 47B) montrent des situations contrastées entre GNA 5 et GNA 400 uniquement pour trois acides aminés : l'acide aspartique (++ à faible dose), l'histidine (+ à faible dose) et la tyrosine (-- à faible dose). Nous ne pouvons pas interpréter ces faibles différences.

Nous pouvons signaler que des stimulations de la croissance par les lectines à mannose strict à faibles concentrations ont aussi été observées avec d'autres insectes telle la bruche *Callosobruchus maculatus* ; ces effets ne dépendent pas du fait que les lectines soient ou non insecticides à très fortes doses (A.M.R. Gatehouse, données non publiées). Ils sont aussi révélés sur des mammifères, et constituent le fondement des propriétés probiotiques de la GNA vis à vis du rat, décrites par Pusztai *et al.* (1990). Ces auteurs montrent que la GNA se lie à *Escherichia coli* et avancent l'hypothèse que la lectine exerce ses effets probiotiques en bloquant la croissance des bactéries de l'intestin moyen (small intestine). Mais cette hypothèse ne s'applique vraisemblablement pas au cas des pucerons, en particulier de *A. pisum* et *M. persicae*, car leurs intestins renfermeraient très peu de germes (Ponsen, 1972 ; Grenier *et al.*, 1994). Le fait que nous ayons observé des effets très différents entre les lectines à mannose strict et la ConA à très faibles doses, bien qu'elles soient toutes toxiques à fortes doses, nous suggère que ces lectines diffèrent dans leur mode d'action et qu'elles pourraient agir sur des cibles différentes dans l'insecte. Le dosage des acides aminés libres des pucerons et de leur miellats semblent bien confirmer cette interprétation.

Si la ConA et la GNA appartiennent toutes les deux au groupe des lectines à mannose/glucose nous avons eu l'occasion d'insister sur le fait que la GNA est une lectine à mannose strict. En effet, cette lectine ne reconnait que le mannose et non le D-glucose ou la N-acétyl-D-glucosamine comme la ConA (Shibuya *et al.*, 1988b ; Kaku et Goldstein, 1989 ; Kaku et Goldstein, 1992).

Trois autres caractéristiques liées aux spécificités osidiques de ces deux lectines permettent de les distinguer :

-1) Brewer et ses collaborateurs ont montré que la ConA reconnaît avec une haute affinité des structures glycanniques tri ou tétra-antennées ayant au moins deux mannoses en positions terminales non réductrices (Bhattacharyya *et al.*, 1987a; Bhattacharyya *et al.*, 1987b; Bhattacharyya et Brewer, 1989; Mandal et Brewer, 1992). Il est d'ailleurs admis que la ConA, comme la PSA, recquière des résidus mannose en position terminale pour se fixer (Kaku et Goldstein, 1992). La ConA se lie par exemple fortement avec le trisaccharide

synthétique branché Man α1-3 (Man α1-6) Man α-OMe et précipite en sa présence (Bhattacharyya *et al.*, 1987a; Bhattacharyya *et al.*, 1987b). L'affinité est 42 fois plus forte pour ce trisaccharide que pour l'α-D-Man *p*-OMe (ou α-D-méthyl mannoside, Brewer *et al.*, 1985). La spécificité osidique de la ConA pour ce sucre-ci, la distingue des lectines à mannose strict. En effet, Kaku et Goldstein (1992) ont montré que les constantes d'association de la GNA et de la NPA avec l'α-D-Man *p*-OMe sont très faibles (89 et 41 M^{-1} respectivement) alors que celle de la ConA est 160 à 500 fois plus forte.

-2) une seconde différence entre les deux lectines réside dans la capacité de la GNA à précipiter en présence d'un oligo-mannoside linéaire (Man_5 = Man α1-3 Man α1-3 Man α1-3Man α1-2) contrairement à la ConA (Kaku et Goldstein, 1992).

-3) Robert et Goldstein (1983 cités par Kaku et Goldstein, 1992) ont rapporté que la plupart des lectines des Légumineuses (et en particulier la ConA) possèdent des sites de fixation à des ligands hydrophobes. La GNA, comme la NPA, ne semble pas comporter de tels sites dans sa structure moléculaire (Kaku et Goldstein, 1992).

Si, comme nous le supposons, l'interaction lectine-puceron est de type lectine-récepteur glycosylé, ces **différences de spécificités osidiques** peuvent expliquer pourquoi les **modes d'action de la ConA et de la GNA** semblent **différer**.

L'étape ultérieure de notre étude consisterait désormais à déterminer les mécanismes mis en jeu dans l'interaction au niveau subcellulaire et moléculaire. Or, bien que les propriétés biologiques des lectines soint étudiées depuis de nombreuses années, les premiers travaux visant à expliquer les interactions moléculaires lectines-oligosaccharides n'ont été publiés que très récemment. Ceci s'explique principalement par la complexicité des phénomènes mis en jeu et des techniques à mettre en oeuvre pour les appréhender.

Les études décrites à ce jour portent uniquement sur des lectines de Légumineuses. Elles permettent de mieux comprendre pourquoi, en dépis de la très forte homologie structurale de certaines lectines, celles-ci présentent des spécificités osidiques parfois très différentes (Debray *et al.*, 1981 ; Debray et Rougé, 1984; Van Eijsden *et al.*, 1994). Les travaux sont basés sur l'étude des structures cristallines de complexes lectine-monosaccharide (Derewenda *et al.*, 1989 ; Bourne *et al.*, 1990b ; Loris *et al.*, 1994) ou de complexes lectine-oligosaccharide (Bourne *et al.*, 1990a ; Bourne *et al.*, 1992 ; Delbaere *et al.*, 1993 ; Rini *et al.*, 1993). Trois groupes d'acides aminés du site de liaison aux monosaccharides des lectines étudiées, sont impliqués directement (liaisons hydrogène) dans l'interaction moléculaire avec le mannose. Imberty et Pérez (1994), et van Eijsden *et al.* (1994) décrivent en particulier les acides aminés intervenant dans l'interaction de la ConA, de la lectine de la lentille (LcH) ou de la lectine du du pois (PSA) avec le mannose. Mais la conformation de la protéine, la présence de cations Mn^{2+} et Ca^{2+} à proximité du site de liaison, ou l'intervention de molécule d'eau pour stabiliser le complexe formé sont autant de facteurs qui sont aussi impliqués dans la spécificité de reconnaissances des sucres par les lectines (Bourne *et al.*, 1990a ; Imberty et Perez, 1994).

Il nous paraît difficile dans le cadre des travaux présentés dans cette thèse de rentrer plus dans les détails de ces interactions mais le modèle biologique dont nous disposons (*A. pisum* / milieux artificiels définis / ConA-GNA) paraît favorable à l'investigation des interactions lectines/oligosaccharides *in vivo*.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

Nous avons choisi d'aborder la conclusion de notre travail en rappelant dans un premier les résultats fondamentaux acquis. Nous en déduisons le potentiel d'utilisation des lectines dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux Homoptères en général et aux pucerons en particulier. Nous avançons ensuite les perspectives à plus ou moins court terme sur lesquelles notre travail débouche. Enfin, il nous a semblé important d'apporter quelques réflexions très succinctes sur l'avenir des plantes transgéniques au moment où la transgénèse tant végétale qu'animale suscite de nombreuses interrogations.

1. Caractéristiques biologiques et mode d'action de la toxicité des lectines à mannose sur *A. pisum*

Le premier objectif de notre travail était d'élargir la "panoplie" des gènes susceptibles d'être utilisés en transgénèse végétale pour créer des plantes résistantes aux pucerons.

Nous avons décrit dans le premier chapitre les protéines actuellement exploitables pour lutter contre divers autres insectes (Coléoptères, Lépidoptères) : toxines de *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus sphaericus* (références dans le tableau 4), polypeptides d'origine fongique (Purcell *et al.*, 1993), venins d'arthropodes (Pang *et al.*, 1992), enzymes (Powell *et al.*, 1993 ; Purcell *et al.*, 1994), inhibiteurs enzymatiques (en particulier inhibiteurs de protéases) et lectines (Gatehouse *et al.*, 1995b). Ce n'est que très récemment que les premiers travaux sur la toxicité de lectines vis-à-vis d'Homoptères ont été initiés (Gatehouse *et al.*, 1992 ; Rahbé et Febvay, 1992 ; Habibi *et al.*, 1993 ; Powell *et al.*, 1993 ; Rahbé et Febvay, 1993). Les anglais de Durham ont rapidement orienté leurs études vers le mode d'action de la GNA, qui s'avère être une toxine assez générale, avec une toxicité intéressante vis-à-vis d'un delphacide et d'une cicadelle ravageurs du riz, et dont le gène était disponible. Parallèlement, à Lyon (et dans un premier temps indépendamment de ces travaux) l'intérêt de l'équipe s'est porté sur les lectines à mannose/glucose. Si la ConA a constitué notre modèle d'étude, nous nous sommes aussi intéressés à la GNA du fait de notre collaboration avec l'équipe de Durham.

Il ressort de notre travail de thèse que la ConA et la GNA induisent à des concentrations relativement faibles (100-200 $\mu g.ml^{-1}$), une réduction significative de la dynamique de reproduction d'*A. pisum* ou de *M. persicae,* bien que leur effet à ces doses sur la croissance larvaire soit modeste, notamment pour la GNA.

Les études d'intoxication aiguë sur six espèces aphidiennes montrent cependant une toxicité différentielle de la ConA, les espèces polyphages telles *Macrosiphum euphorbiae* et *Aulacorthum solani* semblant moins sensibles que les espèces monophages telle *Macrosiphum albifrons*. Aucune relation "classe de lectine-spectre de toxicité" n'apparaît clairement même si les lectines à mannose strict (GNA, NPA) semblent les plus régulièrement actives. Il est intéressant de constater que la toxicité de ces dernières ne se manifeste pas seulement sur les pucerons mais aussi sur le delphacide et la cicadelle du riz, *Nephotettitx cinciteps* et *Nilaparvata lugens* (Powell, 1993). Le spectre d'activité des lectines à mannose, qui sont toxiques contre des Lépidoptères (tableau 4), pourrait donc être élargi à l'ordre des Homoptères.

A notre connaissance, c'est la première fois que le mode d'action d'une lectine sur un insecte est décrit de façon aussi précise. Nous pouvons cependant signaler que Gatehouse *et al*. (1984) et Eisemann *et al.* (1994) ont déjà avancé des hypothèses concernant le mode d'action, respectivement, de la PHA sur une bruche et de la ConA sur une mouche. Sur le puceron modèle *A. pisum* , nous avons démontré que :

- la ConA n'est pas phagorépulsive, et il ne semble pas exagéré de penser qu'*A. pisum* est incapable de détecter sa présence dans son alimentation, jusqu'à des doses relativement élevées (400 µg.ml^{-1}).

- les pucerons mêmes fortement intoxiqués continuent à en ingérer de grandes quantités, malgré un net effet à court terme sur les taux d'ingestion ; il semble manifestement y avoir une phase de "choc toxique", suivie d'une phase d'habituation aux effets de la toxicité (notamment ses effets comportementaux).

- la lectine se fixe dans un premier temps aux cellules épithéliales de l'estomac, mais à très forte concentration, elle transite aussi dans l'intestin. Les lésions induites seraient, en début d'intoxication et même à forte concentration (400 µg.ml^{-1}), réversibles. Le mode d'action de la toxine explique de manière cohérente cette observation. En effet, la ConA n'induit pas une destruction des cellules de l'épithélium, mais semble accélérer fortement un processus naturel de remplacement de la membrane apicale en induisant une hypersécrétion des cellules stomacales.

- l'intoxication par la ConA s'accompagne d'importantes modifications du profil des acides aminés libres des pucerons et de leur miellats. L'hypersécrétion d'arginine, notamment, corrobore l'hypothèse d'une stimulation des voies d'excrétion du puceron.

- plusieurs observations nous suggèrent que le mode d'action de la ConA et de la GNA diffèrent (toxicité/effet probiotique à faibles doses, courbe dose-réponse aux fortes doses, analyse des acides aminés libres des pucerons et de leur miellat). Initialement, nous avions choisi la ConA comme modèle d'étude des effets des lectines à mannose/glucose sur les pucerons. Il s'avère que le mode d'action de la ConA ne peut pas être généralisé aux autres lectines de cette classe. D'une manière générale, même dans le cas de lectines à spécificités osidiques très proches (telles la GNA et la NPA), le mode d'action de chacune des lectines devra être étudié précisément. Les études sur les interactions subcellulaires lectines-sucres justifient notre prudence à ne pas généraliser hâtivement nos résultats.

- nous avons montré et confirmé que les lectines à mannose strict (en particulier la GNA) induisaient un effet probiotique aux faibles concentrations. C'est ce qui pourrait expliquer notamment que les pucerons testés sur la lignée GNA2#23 de pommes de terre transgéniques, se soient montrés plus performants (en terme de fécondité) que les pucerons sur les plantes témoins. Cette observations confirme la nécessité de bien maîtriser l'expression des transgènes pour ne pas être confronter à ce type de problème en plein champ.

2. Implications des connaissances sur la toxicité des lectines sur leur potentiel d'utilisation en protection des cultures

La lecture de nos résultats nous amène à nous poser une première question : **est-il légitime d'envisager la création de plantes transgéniques exprimant le gène d'une lectine pour lutter contre les pucerons ?**

Nous venons de rappeler que, compte tenu des activités de toxines actuellement disponibles, les pucerons doivent ingérer des milieux contenant 100 à 200 µg.ml^{-1} de lectine pour être significativement intoxiqués. Nous admettrons dans un premier temps que nous pouvons extrapoler ces résultats aux conditions *in planta*. Deux autres questions découlent alors de la précédente :

-1) les plantes sont-elles capables d'exprimer des taux élevés de protéines dans leur sève phoémienne ? autrement dit, est-il réaliste de vouloir faire s'exprimer une lectine à un taux de 100-200 µg.ml^{-1} dans la sève d'une plante ?

-2) les biologistes moléculaires sont-ils capables de diriger l'expression d'un gène de lectine dans la sève phloémienne à un taux de cet ordre ?

Du fait de la difficulté d'analyse du compartiment ciblé et des données fragmentaires qui sont disponibles sur sa composition, la réponse à la première question n'est pas aussi simple qu'on pourrait le penser. La sève phloémienne d'un végétal est généralement relativement pauvre en protéines au regard de ses autres composants tels que les acides aminés ou les glucides. Leur concentration, mesurée dans des exsudats de types divers, varie de 0,2 à 2 $mg.ml^{-1}$ pour les espèces végétales "standard" qui ont été étudiées (Fife et al., 1962 ; Hall et Baker, 1972 ; Tammes et Van Die, 1964 ; Ziegler, 1975 cités par Fisher *et al.*, 1992). Néanmoins, chez certaines familles comme les Cucurbitacées ce taux peut être cinquante fois plus élevé : 40 à 100 $mg.ml^{-1}$ (Eschrich et Heyser, 1975; Allen, 1979 ; Cronshaw et Sabnis, 1989) bien que toutes ces protéines, dites P-protéines, ne participent pas de la même manière au compartiment protéique soluble et mobile qui nous intéresse.

Si nous considérons qu'une protéine majeure de ces exsudats peut représenter plus de 10 % des protéines totales, la concentration d'une protéine de ce type peut donc atteindre 20 à 200 $\mu g.ml^{-1}$, voire 4 à 10 $mg.ml^{-1}$ chez les Cucurbitacées. L'approche "plante transgénique résistante à un puceron" semble donc assez réaliste dans un premier temps pour les Cucurbitacées.

Les taux plus faibles de protéines pouvant s'exprimer dans la sève des autres espèces végétales imposera certainement de poursuivre l'effort de recherche pour trouver des lectines ou d'autres toxines plus toxiques encore que ne le sont les lectines à glucose/mannose que nous avons testées. D'autres lectines de cette classe ont été purifiées récemment, en particulier des lectines supplémentaires de la famille des Amaryllidacées (Van Damme *et al.*, 1988). Certaines d'entre elles pourraient révéler des propriétés toxiques encore plus intéressantes que celle du perce-neige ou du Narcisse. Des lectines d'autres classes devront encore être testées. Les résultats obtenus par exemple avec la lectine de l'Amaranthe nous encouragent dans cette voie.

La réponse à la deuxième question nous semble d'ordre technologique, dans la mesure où des promoteurs dits phloème-spécifiques sont *a priori* disponibles et plus ou moins décrits dans la littérature (Bevan *et al.*, 1989 ; Ohl *et al.*, 1990 ; Yang et Russell, 1990 ; Wang *et al.*, 1992 ; Bhattacharyya *et al.*, 1993 ; Bostwick *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994a ; Wang *et al.*, 1994b). Nous avons eu la chance de pouvoir tester les performances biologiques de pucerons sur des pommes de terre transgéniques[107]. Ceci prouve en tout cas que des biologistes moléculaires, en l'occurrence l'équipe de J. Gatehouse de l'Université de Durham et celle du groupe Axis, sont eux-mêmes convaincus du réalisme de l'approche "plantes transgéniques résistantes aux homoptères". A l'heure actuelle, leur travaux s'orientent par exemple aussi vers la recherche d'autres promoteurs permettant l'expression phloémienne, comme celui de la lectine PP2 du potiron (*Cucurbita maxima* ; Wang *et al.*, 1994a).

Le raisonnement précédent repose sur l'**extrapolation des résultats obtenus *in vivo* aux effets susceptibles d'être observés in *planta.*** Nous admettons que cette extrapolation appelle une certaine prudence. Par exemple, nous constatons nous même que le potentiel biotique[108] diffère sensiblement entre les pucerons d'élevage et ceux placés sur milieu artificiel. Mais le type d'étude que nous avons menée implique nécessairement de travailler sur de tels milieux, que l'équipe de Lyon considère par ailleurs comme "optimaux" en première génération, notamment en ce qui concerne la nutrition azotée.

Les dosages de GNA réalisés sur des extraits de feuilles de pommes de terre transgéniques montrent que les niveaux d'expression sont encore assez faibles. Les tests *in vitro* indiquent que les **taux estimés** pour la sève seraient trop faibles pour induire des effets toxiques, or

---

107 Avec des promoteurs non spécifiques (CaMV 35S) mais malheureusement pas avec le promoteur phloème-spécifique actuellement en phase de mise à disposition pour tests chez plusieurs espèces végétales - riz, pomme de terre - (promoteur de la sucrose-synthase de riz, rss1 ; Wang *et al.*, 1992).

108 Capacité de multiplication d'une espèce sous la dépendance de deux facteurs : fécondité des femelles et rapidité de développement.

nous avons observé des effets toxiques significatifs pour certaines des lignées testées (et même très significatif dans un cas).

Nous ne disposons pas d'assez d'éléments pour interpréter complètement ces résultats. Nous ne savons pas, en particulier, si le taux d'ingestion des pucerons sur plante est très supérieur à celui des pucerons sur milieu artificiel[109] ; dans un tel cas, à concentration égale, l'intoxication pourrait bien être plus forte sur plante que sur milieu. Il nous est aussi difficile d'interpréter la variabilité des résultats observée au cours des trois séries de tests effectués sur plantes transgéniques (juillet 93, février 94 et janvier 95)[110]. Néanmoins, ces tests nous paraissent encourageants et permettent d'espérer des résultats très intéressants quand les biologistes moléculaires maîtriseront l'expression phloème-spécifique des transgènes.

Nous avons souligné dans notre étude l'importance de lutter contre les pucerons mais aussi de leur virus associés. Les lectines (nous raisonnons bien sûr sur la base de notre étude sur la ConA) pourraient induire une certaine protection contre les **risques de transmission virale.**

Au **niveau de la culture**, au même titre que les gènes de résistance introduits par sélection variétale classique, les lectines ralentiraient la croissance exponentielle des populations en limitant la fécondité des pucerons, et freineraient l'expansion des colonies et des épidémies virales (limitation de l'épidémie secondaire, et non primaire).

Au **niveau de la plante** : *a priori,* comme les pucerons ne rejettent pas un aliment contenant la lectine, ceux-ci seraient susceptibles de pouvoir transmettre leur virus non persistants mais également aussi les virus circulants. La plante ne devrait donc pas se trouver protégée de ce risque par les lectines, mais l'absence de rejet comportemental fort (antixénose) ne devrait pas non plus laisser prévoir d'aggravation de la vection virale, comme cela arrive avec certains gènes de résistances (Castle et Berger, 1993).

Les caractéristiques des virus circulants laissent cependant présager la possibilité d'une protection. Ces virus sont transmis d'une plante à une autre par la salive des pucerons. Après ingestion, ils traversent la paroi intestinale, se dispersent dans l'hémolymphe et envahissent les glandes salivaires, d'où ils pourront être injectés, avec la salive dans les tissus d'une autre plante. Ce cycle impose donc une absorption des particules virales par les cellules épithéliales mettant en jeu une interaction virus-récepteur (dans les cellules animales, les récepteurs viraux caractérisés sont principalement de nature glycoprotéique et interagissent avec des hémagglutinines virales). L'interaction lectine-récepteur et virus-récepteur présenterait donc une grande analogie. La possibilité d'une interaction compétitive entre certaines lectines et les virus circulants n'est pas exclue, et cette possibilité pourrait être exploitée en marge des propriétés directement toxiques des lectines.

Enfin se pose aussi le problème du **risque d'apparition d'une résistance à l'intoxication.** La ConA semble se lier à un très grand nombre de "récepteurs" de la surface des cellules mésentériques. Cette observation suggère que nous nous trouvons vraisemblablement dans un cas d'interaction "peu" spécifique toxine/"famille de récepteurs" (ou tout au moins récepteurs présents en forte densité), plutôt que dans un cas d'interaction stricte toxine/"récepteur unique". De plus, la lectine agit en accélérant le processus naturel de remplacement de la membrane apicale. Ce mode d'action peut laisser supposer que le risque d'apparition d'une résistance totale à l'intoxication est faible. Dans ce contexte peu spécifique, l'apparition d'un contournement fort de résistance (*i.e.* "vertical") peut s'avérer plus improbable. Cet argument se fonde évidement sur l'hypothèse de l'absence d'une interaction restreinte ConA-récepteur unique, mais notre interprétation reste totalement à prouver. Nous avons également souligné

---

109 La seule référence dont nous disposons qui aborde ce sujet tendrait à le confirmer mais sans donner de chiffre précis (Mittler, 1987).

110 Les conditions expérimentales pourraient par exemple influer sur les résultats. Ainsi, pour les tests avec *Aulacorthum solani* dans la 1ère série, les plantes étaient placées dans une chambre de culture à forte hygrométrie (≈ 90%) et à température élevée (≈25°C) (conditions d'élevage, sur riz, des cicadelles utilisées à Durham) alors que dans la deuxième série les conditions étaient celles que nous avons aussi à Lyon (H° : 50-70 % ; température 20°C ± 1).

en fin de discussion du chapitre 3 qu'un danger de contournement comportemental de la toxicité nous semble minime dans la mesure où la lectine n'est pas phagorépulsive et que la composante comportementale de l'intoxication est plus indirecte. Enfin, le tube digestif des pucerons ne semble pas contenir le bagage enzymatique nécessaire à une éventuelle destruction protéolytique de la lectine. D'une façon générale, les pucerons devraient s'avérer moins aptes à contourner une résistance d'origine protéique par modification de l'équipement protéolytique, comme cela semble se passer pour certains inhibiteurs de protéases (Broadway, 1995), et qui a déjà été signalé pour d'autres toxines comme les inhibiteurs ribosomaux (RIP - Gatehouse *et al.*, 1990a).

3. Perspectives

Pour des raisons indépendantes de ce travail de thèse, nous avons du écourter sensiblement notre étude. Ceci nous a imposé de faire des choix. Nous sommes conscients de ne pas avoir approfondi certaines voies. C'est notamment le cas des observations en microscopie électronique et de la caractérisation biochimique (moléculaire) de l'interaction ConA/estomac.

Nos objectifs à **court terme** seront donc :

- la caractérisation plus précise de l'intoxication cellulaire par la ConA sur *A. pisum.* Nous ferons appel à la microscopie électronique pour décrire les effets de l'intoxication. Nous observerons ainsi les effets de doses croissantes de lectine et les effets au cours du temps. Une attention particulière sera portée sur d'éventuelles lésions au niveau de la bordure striée des cellules épithéliales et sur l'identification structurale du phénomène d'exfoliation stomacale L'utilisation de ConA marquée par de l'or colloidal devrait éventuellement nous permettre de localiser le(s) site(s) de liaison de la lectine au niveau subcellulaire et nous indiquer si elle est absorbée par la membrane apicale. Nos investigations se porteront aussi sur le mode d'action de la ConA au niveau de l'intestin ;

- la quantification du nombre de molécules de ConA fixées par l'estomac et l'intestin (caractéristiques de saturation) en utilisant de la lectine radioactive, puisqu'un des problèmes majeurs que nous avons rencontré dans les dosages immunologiques sur pucerons est la solubilisation de la ConA complexée. Des quantifications après électrophorèse dénaturante et immunoempreinte sont également envisageables (Western Blot) ;

- l'histofluorescence et les expériences d'immunomarquage sur coupes fines pourront être reconduites avec des larves intoxiquées par de la ConA et de la GNA en présence ou non de sucre approprié ;

- l'étude sur milieu artificiel de l'association d'une lectine avec une autre toxine (inhibiteur de protéase, chitinase). Une des stratégie, pour pallier au risque d'apparition de résistance aux toxines transférées est en effet d'exprimer simultanément des protéines au mode d'action très différent. Outre les effets de synergie toxique que l'on peut attendre, cet aspect de l'évolution des populations de ravageurs est fondamentale pour le succès de l'utilisation des variétés résistantes. La simplicité de la mise en oeuvre des tests sur pucerons est un atout certain pour les études fines de synergie. Mais l'impossibilité actuelle d'un élevage continu en milieu artificiel est un réel obstacle à l'approche évolutive du problème de contournement des résistances "transgéniques" chez les pucerons et aux expériences à moyen terme.

A **plus long terme,** des études sur la nature biochimique des récepteurs mis en jeu dans l'intoxication pourront être entreprises. L'isolement des protéines de la bordure striée (par exemple celles excrétées dans le miellat) par Western Blot (dépôt et transfert sur membrane de nitrocellulose après électrophorèse) puis le marquage avec une lectine biotinylée est une technique couramment utilisée pour caractériser les glycoprotéines membranaires. Elle pourrait être appliquée avec la ConA ou la GNA. Nous pouvons aussi envisager d'isoler les récepteurs par chromatographie d'affinité en vue de leur caractérisation biochimique. C'est initialement ce qui était prévu dans la partie finale de cette thèse.

Nous avons fait remarquer précédemment l'importance de conduire des tests *in planta* en atmosphère contrôlée pour extrapoler les résultats obtenus sur milieu artificiel. Mais l'ultime étape des essais en plein champs pourra seule permettre de juger de l'efficacité de la stratégie mise en oeuvre. La disponibilité de plantes transgéniques exprimant la lectine avec un promoteur adéquat est le préalable à cette étape ultérieure de développement.

Les effets des lectines sur la faune auxiliaire devra aussi être étudiée. Exprimées dans la sève phloémienne, des lectines pourraient par exemple se retrouver dans le nectar des fleurs et intoxiquer les abeilles et les autres espèces pollinisatrices. Dès l'obtention de construction phloème-spécifique, on pourra tester facilement cette possibilité. Il faudra également s'assurer de l'innocuité des ces protéines sur les mammifères et les humains. Les études toxicologiques sont déjà largement entamées pour la ConA et aussi la GNA. Mais *a priori*, l'un des critères de choix au départ pour sélectionner le gène d'une lectine est précisément l'innocuité de celle-ci. C'est ce qui explique notamment (outre ses propriétés insecticides) l'intérêt de l'équipe de J. Gatehouse pour la GNA.

4. Quel avenir pour les plantes transgéniques ?

Si la disponibilité de variétés transgéniques résistantes aux insectes est déjà un fait accompli ou imminent (tableau 4), l'évolution de la stratégie et de son impact restent incertain. A moyen terme, elle semble encore devoir dépendre des résultats des études de toxicité au niveau cellulaire et des biologistes moléculaires, en particulier des réponses techniques que ces derniers apporteront aux faiblesses de certaines constructions disponibles (instabilités et effets positionnels notamment). A long terme, elle dépendra essentiellement de son acceptabilité par les autorités et le public. En effet, la création de plantes transgéniques et d'une manière plus générale la transgénèse végétale ne va pas sans soulever un grand nombre de problèmes d'ordre éthique. Parmi ceux-ci figurent notamment la crainte de voir se rompre certains équilibres biologiques. Plus prosaïquement surgissent aussi divers problèmes liés à la politique des brevets, à la propriété intellectuelle vis à vis d'être vivants génétiquement modifiés ou encore aux conséquences (bénéfiques ou non) qu'aura le développement de la transgénèse sur le marché agricole traditionnel ainsi que sur les échanges entre pays industrialisés et pays en voie de développement.

Enfin, si nous avons beaucoup parlé des plantes transgéniques, nous sommes conscients que la génétique classique est loin d'avoir perdu de son efficacité. De fait, les exploits de la génétique moléculaire ne font qu'apporter au mieux un outil de plus pour remodeler les génomes, ouvrant ainsi un "pool" nouveau de gènes à l'exploitation par l'homme, et permettant "simplement" de surmonter certaines barrières génétiques qui étaient jusqu'ici fermées.

Bibliographie

Alford, D.V., Commeau, M.F., Coutin, R. et Fraval, A. *Ravageurs des végétaux d'ornement : arbres, arbustes, fleurs*. Paris : Ed° Manson Publishing Ltd. & INRA, 1994. 464 p.

Allen, A.K. A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that as a specificity for β-14-linked N-acetyl-glucosamine oligosaccharides. *Biochem. J.*, 1979, Vol. 183, p. 133-137.

Allen, A.K., Neuberger, A. et Sharon, N. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.*, 1973, Vol. 131, p. 151-162.

Allen, W.A. et Rajotte, E.G. The changing role of extension entomology in the IPM area. *Annu. Rev. Entomol.*, 1990, Vol. 35, p. 379-397.

Allingham, P., Kerlin, R.L., Tellam, R.L., Briscoe, S.J. et Standfast, H.A. Passage of host immunoglobulin across the midgut epithelium into the haemolymph of blood-fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. *J. Insect Physiol.*, 1992, Vol. 38, p. 9-17.

Alston, F.H. et Briggs, J.B. Inheritance of hypersensitivity to rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* in apple. *Can. J. Genet. Cytol.*, 1970, Vol. 12, p. 257-258.

Aronson, A.I. *Plant Breeding Reviews.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 1994. *Bacillus thuringiensis* and its use as a biological insecticide, Vol. 12, p. 19-45.

Auclair, J.L. Host plant resistance in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed°Elsevier, 1989, Vol. 2C, p. 225-266.

Ayouba, A., Causse, H., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Bourne, Y., Cambillau, C. et Rougé, P. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1994, Vol. 22, N°2, p. 153-159.

Bajar, A., Podila, G.K. et Kolattukudy, P.E. Identification of a fungal cutinase promoter that is inducible by a plant signal via a phosphorylated trans-acting factor. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1991, Vol. 88, p. 8208-8212.

Bale, J.S., Strathdee, A.T. et Strathdee, F.C. Effects of low temperature on the arctic aphid *Acyrthosiphon brevicorne*. *Funct. Ecol.*, 1994, Vol. 8, p. 621-626.

Banwell, J.G., Boldt, D.H., Meyers, J. et Weber, F.L.J. Phytohemagglutinin derived from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris)*: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenterology*, 1983, Vol. 84, p. 506-515.

Barbieri, L., Battelli, M.G. et Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, Vol. 1154, N°3, p. 237-282.

Barendse, G.W.M. et Peeters, T.J.M. Multiple hormonal control in plants. *Acta Bot. Neer.*, 1995, Vol. 44, N°1, p. 3-17.

Barondes, S.H. Bifunctionnal properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.*, 1988, Vol. 13, p. 480-482.

Barton, K.A., Whiteley, H.R. et Yang, N.S. *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.*, 1987, Vol. 85, p. 1103-1109.

Berthomieu, P. *Obtention de choux transgéniques tolérants aux noctuelles par transformation génétique avec un gène codant pour une δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis*. Thèse 3ème Cycle : Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 1992.

Bevan, M., Shufflebottom, D., Edwards, K., Jefferson, R. et Schuch, W. Tissue-specific and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *EMBO J.*, 1989, Vol. 8, N°7, p. 1899-1906.

Bhattacharyya, L. et Brewer, C.F. Interactions of concanavalin A with asparagine-linked glycopeptides: structure/activity relationships of the binding and precipitation of oligomannose and bisected hybrid-type glycopeptides with concanavalin A. *Eur. J. Biochem.*, 1989, Vol. 178, p. 721-726.

Bhattacharyya, L., Ceccarini, C., Lorenzoni, P. et Brewer, C.F. Concanavalin A interactions with asparagine-linked glycopeptides: bivalency of high mannose and bisected hybrid type glycopepides. *J. Biol. Chem.*, 1987a, Vol. 262, N°3, p. 1288-1293.

Bhattacharyya, L., Haraldsson, M. et Brewer, C.F. Concanavalin A interactions with asparagine-linked glycopeptides: bivalency of bisected complex type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1987b, Vol. 262, N°3, p. 1294-1299.

Bhattacharyya, P.M., Peng, J.Y., Elmer, J.S., Laco, G., Shen, P., Kaniewska, M.B., Kononowicz, H., Wen, F.J., Hodges, T.K. et Beachy, R.N. Specificity of a promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression in phloem tissues. *Plant J.*, 1993, Vol. 4, N°1, p. 71-79.

Bieri, M., Baumgärtner, J.U., Bianchi, G., Delucchi, V. et Von Arx, R. Development and fecundity of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* Harris as affected by constant temperatures and pea varieties. *Mit. Schweiz. Entomol. Gesel.*, 1983, Vol. 56, p. 163-171.

Billings, P.C., Brandon, D.L. et Habres, J.M. Internalisation of the bowman-birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells. *Eur. J. Cancer*, 1991, Vol. 27, p. 903-908.

Birch, L.C. The intrisic rate of natural increase of an insect population. *J. anim. Ecol.*, 1948, Vol. 17, p. 15-16.

Blackman, R.L. et Eastop, V.F. *Aphids on the world's crops : an identification guide*. Chichester (USA) : Ed° John Wiley & Sons, 1985. 466 p.

Bliss, C.I. The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. Appl. Biol.*, 1935, Vol. 22, p. 134-167.

Bode, W. et Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 1992, Vol. 204, p. 422-451.

Bonadé Bottino, M. *Défense du colza contre les insectes phytophages déprédateurs : étude d'une stratégie basée sur l'expression d'inhibiteurs de protéases dans la plante*. Thèse 3ème cycle : Paris-Sud , Centre d'Orsay, 1993.

Bonnot, G. et Febvay, G. AjustNonLin, un logiciel d'ajustement non linéaire sur Mac. *Micro Bulletin*, 1992, Vol. 44, p. 101-108.

Bostwick, D.E., Skaggs, M.I. et Thompson, G.A. Organization and characterization of *Cucurbita* phloem lectin genes. *Plant Mol. Biol.*, 1994, Vol. 26, N°3, p. 887-897.

Boulter, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry*, 1993, Vol. 34, N°6, p. 1453-1466.

Boulter, D., Edwards, G.A., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. et Hilder, V.A. Additive protective effects of different plant-derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Protection*, 1990a, Vol. 9, p. 351-354.

Boulter, D., Gatehouse, A.M.R. et Hilder, V.A. Engineering enhanced natural resistance to insect pests: a case study. *Plant Gene Transf.*, 1990b, Vol. 129, p. 267-273.

Bourne, Y., Rougé, P. et Cambillau, C. X-ray structure of a (α-man(1-3)β-Man(1-4)GlcNac)-lectin complex at 2.1 A resolution. *J. Biol. Chem.*, 1990a, Vol. 265, N°30, p. 18161-18165.

Bourne, Y., Rougé, P. et Cambillau, C. X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.3 A resolution. *J. Biol. Mol.*, 1992, Vol. 267, N°1, p. 197-203.

Bourne, Y., Roussel, A., Frey, M., Rougé, P., Fontecilla-Camps, J.C. et Cambillau, C. Three-dimensional crystal structures of complexes of *Lathyrus ochrus* isolectin I with glucose and mannose: fine specificity of the monosaccharide binding site. *Proteins*, 1990b, Vol. 8, p. 365-376.

Bowers, W.S., Nishino, C., Montgomery, M.E. et Nault, L.R. Structure-activity relationship of analogs of the aphid alarm pheromone, (E)-β-farnesene. *J. Insect Physiol.*, 1977, Vol. 23, p. 697-701.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, Vol. 72, p. 248-254.

Brewer, C.F., Bhattacharyya, L., Brown, R.D. et Koenig, S.H. Interactions of Concanavalin A with a trimannosyl oligosaccharide fragment of complex and high mannose type glycopeptides. *Biochem. Bio. Res. Comm.*, 1985, Vol. 1985, N°29, p. 1066-1071.

Brey, P.T., Ohayon, H., Lesourd, M., Castex, H., Roucache, J. et Latge, J.P. Ultrastructure and chemical composition of the outer layers of the cuticle of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, Vol. 82A, N°2, p. 401-411.

Broadway, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors ? *J. Insect Physiol.*, 1995, Vol. 41, N°2, p. 107-116.

Broadway, R.M. et Duffey, S.S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 1986, Vol. 32, N°10, p. 827-833.

Broadway, R.M., Duffey, S.S., Pearce, G. et Ryan, C.A. Plant proteinase inhibitors: a defense against herbivorous insects ? *Entomol. exp. appl.*, 1986, Vol. 41, p. 33-38.

Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. et Peumans, W.J. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. *Biochem. J.*, 1984, Vol. 221, p. 163-169.

Broekaert, W.F., Vanparijs, J., Leyns, F., Joos, H. et Peumans, W.J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 1989, Vol. 245, p. 1100-1102.

Broglie, R. et Broglie, K. Chitinase gene expression in transgenic plants - a molecular approach to understanding plant defence responses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1993, Vol. 342, p. 265-270.

Burgess, E.P.J., Main, C.A., Stevens, P.S., Christeller, J.T., Gatehouse, A.M.R. et Laing, W.A. Effects of protease inhibitor concentration and combinations on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. *J. Insect. Physiol.*, 1994, Vol. 40, N°9, p. 803-811.

Caillaud, C.M. *Analyse des mécanismes de la résistance de lignées de blé Triticum monococcum au puceron des céréales Sitobion avenae*. Thèse 3ème Cycle : Paris XI, Centre d'Orsay, 1994.

Calatayud, P.A., Rahbé, Y., Tjallingii, W.F., Tertuliano, M. et Le Rü, B. Electrically recorded feeding behaviour of cassava mealybug on host and non-host plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 1994, Vol. 72, N°3, p. 219-232.

Cao, J., Wang, Y.C., Klein, T.M., Sanford, J. et Wu, R. *Plant gene transfer*. New York : Ed° Alan Liss, 1990. Transformation of rice and maize using the biolistic process, Vol. 129, p. 21-33.

Carver, M. Biological control of aphids in *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 141-166.

Castle, S.J. et Berger, P.H. Rates of growth and increase of Myzus persicae on virus-infected potatoes according to type of virus-vector relationship. *Entomol. exp. appl.*, 1993, Vol. 69, p. 51-60.

Chambers, R.J. Syrphidae in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988. Vol. 2B, p. 259-270.

Cheng, J., Bolyard, M.G., Saxena, R.C. et Sticklen, M.B. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a δ-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. *Plant Sci.*, 1992, Vol. 81, p. 83-91.

Chessel, D. et Dolédec, S. *Logiciel ADE - Version 3.6 - Analyses multivariées et expression graphiques des données environnementales*. Villeurbanne (Fr) : URA CNRS 1451 - UCB Lyon 1, 1994.

Chrispeels, M.J. et Raikhel, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*, 1991, Vol. 3, p. 1-9.

Cloutier, C. et Cloutier, C. Chap.1 - Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures in *La lutte biologique.* Boucherville (Canada) : Ed° Gaëtan Morin, 1992. p. 19-88.

Comai, L. Impact of plant genetic engineering on foods and nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 1993, Vol. 13, p. 191-215.

Comeau, A. Chap.23 - La résistance aux pucerons : aspects théoriques et pratiques in *La lutte biologique.* Boucherville (Canada) : Ed° Gaëtan Morin, 1992. p. 433-449.

Conover, W.J. *Pratical nonparametric statistics*. 2ed. New York : Ed° John Wiley & Sons, 1980. 495 p.

Corcuera, L.J. Plant chemicals and resistance of cereals to aphids. *Ambio*, 1990, Vol. 19, p. 365-367.

Cronshaw, J. et Sabnis, D.D. Phloem proteins in *Sieve elements - comparative structure, induction and development.* Berlin : Springer, 1989. p. 257-283.

Cunningham, J.C. Baculoviruses: their status compared to *Bacillus thuringiensis* as microbial insecticides. *Outl. Agric.*, 1988, Vol. 17, p. 10-17.

Czapla, T.H. et Lang, B.A. Effect of plant lectins on the larval development of European Corn Borer (Lepidoptera : *Pyralidae*) and Southern Corn Rootworm (Coleoptera : *Chrysomelidae*). *J. econ. Entomol.*, 1990, Vol. 83, p. 2480-2485.

Dajoz, R. *Dynamique des populations*. Paris : Ed° Masson et Cie, 1974. 301 p.

Dale, P.J. The release of transgenic plants into agriculture - review. *J. Agr. Sci.*, 1993, Vol. 120, p. 1-5.

Dale, P.J., Irwin, J.A. et Scheffler, J.A. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breed.*, 1993, Vol. 111, N°1, p. 1-22.

Dawson, G.W., Hallahan, D.L., Mudd, A., Patel, M.M., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. et Wallsgrove, R.M. Secondary plant metabolites as targets for genetic modification of crops for pest resistance. *Pest. Sc.*, 1989, Vol. 27, p. 191-201.

DDE-Caen *...à Caen, l'élevage des coccinelles à 10 ans*. Direction des Espaces Verts, 1984.

Deblock, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica*, 1993, Vol. 71, N°1-2, p. 1-14.

Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. et Montreuil, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopetides related N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.*, 1981, Vol. 117, p. 41-55.

Debray, H. et Rougé, P. The fine sugar specificity of the Lathyrus ochrus seed lectins and isolectins. *FEBS Lett.*, 1984, Vol. 176, p. 120-124.

Delannay, X., Lavallee, B.J., Proksch, R.K., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Dodson, R.B., Augustine, J.J., Layton, J.G. et Fischhoff, D.A. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* insect control protein. *Biotechnology*, 1989, Vol. 7, N°12, p. 1265-1269.

Delbaere, L.T.J., Vandonselaar, M., Prasad, L., Quail, J.W., Wilson, K.S. et Dauter, Z. Structure of the Lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b Human blood group determinant at 2.0 A resolution. *J. Mol. Biol.*, 1993, Vol. 230, p. 930-965.

Derewenda, J., Yariv, J., Helliwell, J.R., Kalb, A.J., Dodson, E.J., Papiz, M.Z., Wan, T. et Campbell, J. The stucture of the saccharide-binding site of Concanavalin A. *EMBO J.*, 1989, Vol. 8, p. 2189-2193.

Devonshire, A.L. Resistance of aphids to insecticides in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 123-140.

Diaz, L.C., Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J., Lugtenberg, B.J.J. et Kijne, J.W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, 1989, Vol. 338, p. 579-581.

Dixon, A.F.G. The way of life of aphids: host specificity, speciation and distribution in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987.Vol. 2A, p. 197-208.

Dixon, H.B.F. Defining a lectin. *Nature*, 1981, Vol. 292, p. 192.

Dobbins, J.W., Laurenson, J.P., Gorelick, F.S. et Banwell, J.E. Phytohemagglutinin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibits sodium and chloride absorption in the rabbit ileum. *Gastroenterology*, 1986, Vol. 90, p. 1907-1913.

Dong, T.X., Ng, T.B., Wong, R.N.S., Yeung, H.W. et Xu, G.J. Investigation of hemagglutinating activity in seeds of various *Trichosanthes* species (Family Cucurbitaceae) and comparison of lectins isolated from seeds and tubers of *Trichosanthes kirilowii*. *Int. J. Biochem.*, 1993, Vol. 25, N°3, p. 411-414.

Douglas, A.E. The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecol. Entomol*., 1993, Vol. 18, N°1, p. 31-38.

Dreyer, D.L. et Jones, K.C. Feeding deterrency of flavonoids and related phenolics towards *Schizaphis graminum* and *Myzus persicae* : aphid feeding deterrent in wheat. *Phytochemistry*, 1981, Vol. 20, p. 2489-2493.

Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N., Becker, J.W., Waxdal, M.J. et Wang, J.L. Covalent and three-dimensionnal structure of Concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, Vol. 62, p. 2580-2585.

Efron, B. *The jackknife, the bootstrap and other resampling plans*. Philadelphia : Society for industrial and applied mathematics (SIAM), Ed° J.W. Arrowsmith, 1982. Vol. 1, 92 p.

Eisemann, C.H., Donaldson, R.A., Pearson, R.D., Cadogan, L.C., Vuocolo, T. et Tellam, R.L. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Ent. exp. applic.*, 1994, Vol. 72, p. 1-10.

Eschrich, W. et Heyser, W. Biochemistry of phloem constituents in *Encyclopedia of plant physiology*. Berlin (GER) : Springer Verlag, 1975. Vol. 3, p. 101-137.

Etzler, M.E. Distribution and function of plant lectins in*The lectins: properties, functions and applications in biology and medecine.* Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J. , Acadamic Press, Inc., 1986. p. 371-437.

Febvay, G., Bonnin, J., Rahbé, Y., Bournoville, R., Delrot, S. et Bonnemain, J.L. Resistance of different lucerne cultivars to the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* : influence of phloem composition on aphid fecundity. *Entomol. exp. appl.*, 1988a, Vol. 48, N°2, p. 127-134.

Febvay, G., Liadouze, I., Guillaud, J. et Bonnot, G. Analysis of energetic aminoacid metabolism in *Acyrthosiphon pisum*: a multidimensional approach to amino acid metabolism in aphids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1995, Vol.29, p. 45-69.

Febvay, G. et Rahbé, Y. La méthode des probits sur Macintosh. *Micro Bulletin*, 1991, Vol. 41, p. 117-119.

Febvay, G., Rahbé, Y., Delobel, B. et Bournoville, R. Résistance de la luzerne (*Medicago sativa* L) au puceron du pois (*Acyrthosiphon pisum* Harris) (Homoptera): bases nutritionnelles. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, 1988b, Vol. 24, N°4, p. 473.

Febvay, G., Sauvion, N. et Rahbé, Y. A Macintosh program for the analysis of EPGrams: an example to the analysis of melon resistance to *Aphis gossypii. XIX International Congress of Entomology*, 1992. Beijing (CHI) 28/06-04/07 1992.

Ferrari, C., Barbieri, L. et Stirpe, F. Effects of plant ribosome-inactivating proteins on ribosomes from *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, Vol. 100B, N°2, p. 223-227.

Fischhoff, D., Bowdish, K., Perlak, F., Marone, P., McCoormick, S., Niedermeyer, J., Dean, D., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E., Rochester, D., Rogers, S. et Fraley, R. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology*, 1987, Vol. 5, p. 807-813.

Fisher, D.B., Wu, Y. et Ku, M.S.B. Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol.*, 1992, Vol. 100, N°3, p. 1433-1441.

Forbes, A.R. The morphology, and fine structure of the gut of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)(Homoptera : Aphididae). *Mem. ent. Soc. Can.*, 1964, Vol. 36, p. 1-74.

Foriers, A., Lebrun, E., Van Rapenbush, R., de Neve, R. et Strosberg, A.D. The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin amino acid sequence determination and prediction of the secondary structure. *J. Biol. Chem.*, 1981, Vol. 256, p. 5550-5560.

Forrest, J.M.S. Galling aphids in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 341-354.

Fraval, D. *Dossier de la cellule environnement de l'INRA : la lutte biologique*. Paris : A. Fraval, Ed° INRA, 1993. Vol. 5, 238 p.

Frazer, B.D. Coccinellidae in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988a Vol. 2B, p. 231-248.

Frazer, B.D. Predators in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988b. Vol. 2B, p. 217-230.

Gatehouse, A.M.R. et Boulter, D. Assessment of antimetabolic effects of trypsin inhibitors from Cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *J. Sci. Food Agric.*, 1983, Vol. 34, p. 345-350.

Gatehouse, A.M.R., Boulter, D. et Hilder, V.A. Novel insect resistance using protease inhibitor genes in *Molecular Approaches to Crop Protection.* 1991a. p. 63-77.

Gatehouse, A.M.R., Dewey, F.M., Dove, J., Fenton, K.A. et Pusztai, A. Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of the larvae of *Callosobruchus maculatus*: mechanism of toxicity. *J. Sci. Food Agric.*, 1984, Vol. 35, p. 373-380.

Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Rahbe, Y., Newell, C.A., Merryweather, A. et Gatehouse, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid Myzus persicae. *Entomol. exp. appl.*, 1995a, soumis

Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Rahbé, Y., Newell, C.A., Merryweather, A. et Gatehouse, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. exp. appl.*, 1995b, *soumis*

Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Powel, K., Boulter, D. et Gatehouse, J.A. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance in *Proc. 8th Int. Symp. Insect-Plant Relationships*. Dordrecht (NDL) : S.B.J. Menken, J.H. Visser & P. Harrewijn, Ed° Kluwer Acad. Publ., 1992. p. 221-234.

Gatehouse, A.M.R., Howe, D.S., Flemming, J.E., Hilder, V.A. et Gatehouse, J.A. Biochemical basis of insect resistance in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. *J. Sci. Food Agric*., 1991b, Vol. 55, p. 63-74.

Gatehouse, A.M.R., Minney, B.H.P., Dobie, P. et Hilder, V.A. Biochemical resistance to bruchid attack in legume seeds: investigation and exploitation in *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution.* Dordrecht (NDL) : Fujii, K., Gatehouse, A.M.R., Johnso, C.D., Mitchel, R., Yoshida, T., Ed° Kluwer Acad. Publ., 1990b. p. 241-256.

Gatehouse, A.M.R., Powell, K.S., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J. et Gatehouse, J.A. Chap.3 - Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection in *Lectins, Biomedical perspectives.* London : A. Pusztai & S. Bardocz, Ed° Francis & Taylor, 1995c. , p. x-x

Gatehouse, A.M.R., Shackley, S.J., Fenton, K.A., Bryden, J. et Pusztai, A. Mechanism of seed lectin tolerance by a major insect storage of *Phaseolus vulgaris*, *Acanthoscelides obtectus*. *J. Sci. Food Agric.*, 1989, Vol. 47, p. 269-280.

Gatehouse, A.M.R., Shi, Y., Powell, K.S., Brough, C., Hilder, V.A., Hamilton, W.D.O., Newell, C.A., Merryweather, A., Boulter, D. et Gatehouse, J.A. Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philos Trans. R. Soc. Lond [Biol]*, 1993, Vol. 342, N°1301, p. 279-286.

Georghiou, G.P. *The occurence of resistance to pesticides in arthropods: an index of cases reported through 1980*. Rome : FAO, 1981. 192 p.

Gibson, R.W. et Rice, A.D. Modifying aphid behaviour in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 209-224.

Girousse, C., Bonnemain, J.L., Delrot, S. et Bournoville, R. Sugar and amino acid composition of phloem sap of *Medicago sativa*: a comparative study of two collecting methods. *Plant Physiol. Biochem.*, 1991, Vol. 29, p. 41-48.

Girousse, C. et Bournoville, R. Role of phloem sap quality and exudation characteristics on performance of pea aphid grown on lucerne genotypes. *Entomol. exp. appl.*, 1994, Vol. 70, p. 227-235.

Givovich, A., Sandstrom, J., Niemeyer, H.M. et Pettersson, J. Presence of a hydroxamic acid glucoside in wheat phloem sap, and its consequences for performance of *Rhopalosiphum padi* (L) (Homoptera, Aphididae). *J. chem. Ecol.*, 1994, Vol. 20, N°8, p. 1923-1930.

Goldstein, I.J. et Hayes, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1978, Vol. 35, p. 127-334.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. et Sharon, N. What should be called a lectin. *Nature*, 1980, Vol. 285, p. 66.

Goldstein, I.J. et Poretz, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medecine.* Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J., Acadamic Press Inc., 1986. p. 35-249.

Gould, F. Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plant. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 1984, Vol. 30, p. 34-41.

Graf, B., Baumgärtner, J. et Gutierrez, A.P. Modeling agroecosystem dynamics with the metabolic pool approach. *Mit. Schweiz. Entomol. Gesel.*, 1990, Vol. 63, p. 465-476.

Grassé, P.P. Super-ordre des Hémiptéroides - Appareil digestif et ses annexes in *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie.* Paris : Ed° Masson et Cie, 1951. Vol. 10, Fasc. II, p. 1460-1471.

Greer, F. et Pusztai, A. Toxicity of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in rats: changes in intestinal permeability. *Digestion*, 1985, Vol. 32, p. 42-46.

Gregory, P., Tingey, W.M., Ave, D.A. et Bouthyette, P.Y. Potato glandular trichomes: a physicochemical defense mechanism against insects in *Natural resistance of plants to pests : roles of allelochemicals.* Whashington : Green M.B. & Hedin P.A. (Eds.), American Chemical Society, 1986. p. 160-167.

Grenier, A.M., Nardon, C. et Rahbé, Y. Observations on the micro-organisms occuring in the gut of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Entomol. exp. appl.*, 1994, Vol. 70, p. 91-96.

Griffiths, D.C. et Pickett, J.A. A potentiel application of aphid alarm pheromones. *Entomol. exp. appl.*, 1980, Vol. 27, p. 199-201.

Grison, P. *Chronique historique de la zoologie agricole française*. Millau (Fr) : Ed° INRA, 1992. Vol. 1, 366 p.

Habermann, E. Bee and wasp venoms. *Science*, 1972, Vol. 177, p. 314-322.

Habibi, J., Backus, E.A. et Czapla, T.H. Plant lectins affect survival of the potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomo.*, 1993, Vol. 86, N°3, p. 945-951.

Hankins, C.N., Kindinger, J.I. et Shannon, L.M. The lectins of *Sophora japonica*: II purification, properties, and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark. *Plant Physiol.*, 1988, Vol. 86, p. 67-70.

Harrewijn, P. Integrated control of potato aphids in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 279-284.

Heie, O.E. Palaeontology and phylogeny in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 367-392.

Heie, O.E. Why are there so few aphid species in the temperate areas of the southern hemisphere ? *Eur. J. Entomol.*, 1994, Vol. 91, N°1, p. 127-133.

Herrbach, E. Rôle des sémiochimiques dans les relations pucerons-plantes. I-Généralités et phéromones d'alarme. *Agronomie*, 1985a, Vol. 5, N°3, p. 283-286.

Herrbach, E. Rôle des sémiochimiques dans les relations pucerons-plantes. II-Les substances allélochimiques. *Agronomie*, 1985b, Vol. 5, N°4, p. 375-384.

Herrbach, E. Alarm pheromones and allelochemics as a means of aphid control. *Neth. J. Plant Path.*, 1992, Vol. 98, p. 63-71.

Higgins, T.J.V., Chandler, P.M., Zurawski, G., Button, S.C. et Spencer, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. *J. Biol. Chem.*, 1983, Vol. 258, p. 9544-9549.

Hilder, V.A. et Gatehouse, A.M.R. Phenotypic cost of an extra gene. *Transgenic Res.*, 1991, Vol. 1, p. 54-60.

Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R. et Boulter, D. Potential for exploiting plant genes to genetically engineer insect resistance, exemplified by the Cowpea Trypsin Inhibitor gene. *Pestic. Sci.*, 1989, Vol. 27, p. 165-171.

Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R. et Boulter, D. Transgenic plants conferring insect tolerance: protease inhibitor approach. *Transgenic plants*, 1993, Vol. 1, p. 317-338.

Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. et Boulter, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 1987, Vol. 300, p. 160-163.

Hilder, V.A., Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., Gatehouse, L.N., Shi, Y., Hamilton, W.D., Merryweather, A., Newell, C.A., Timans, J.C., Peumans, W.J., Vandamme, E.J.M. et Boulter, D. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res.*, 1994, Vol. 4, p. 18-25.

Hines, M.E., Nielsen, S.S., Shade, R.E. et Pomeroy, M.A. The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and the Bowman-Birk inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus*. *Entomol. exp. appl.*, 1990, Vol. 57, N°3, p. 201-207.

Horejsi, V., Haskovec, C. et Kocourek, J. Studies on lectin. XXXVIII-Isolation and characterization of the lectin from black locust bark (*Robinia pseudoacacia* L.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1978, Vol. 532, p. 98-104.

Horejsi, V. et Kocourek, J. Studies on phytohemagglutinins. XVII-Some properties of the anti-H-phytohemagglutinin of the furze seeds (*Ulex europaeus* L.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, Vol. 336, p. 329-337.

Huang, H.C., Harper, A.M., Kokko, E.G. et Howard, R.J. Aphis transmission of *Verticillium albo-atrum* to alfalfa. *Can. J. Plant Pathol.*, 1981, Vol. 5, p. 141-147.

Huesing, J.E., Murdock, L.L. et Shade, R.E. Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry*, 1991a, Vol. 30, N°11, p. 3565-3568.

Huesing, J.E., Shade, R.E., Chrispeels, M.J. et Murdock, L.L. α-amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to Cowpea Weevil. *Plant Physiol.*, 1991b, Vol. 96, p. 993-996.

Hughes, R.D. Biological control in the open field in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 167-198.

Hull, R. Risks in using transgenic plants ? *Science*, 1994, Vol. 264, N°5166, p. 1649-1650.

Ilharco, F.A. et van Harten, A. Systematics in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 51-78.

Imberty, A. et Perez, S. Molecular modelling of protein carbohydrate interactions understanding the specificities of two legume lectins towards oligosaccharides. *Glycobiology*, 1994, Vol. 4, N°3, p. 351-366.

Iperti, G. Comportement naturel des coccinelles aphidiphages du Sud-Est de la France : leur type de spécificité, leur action prédatrice sur *Aphis fabae*. *Entomophaga*, 1966, Vol. 11, N°2, p. 203-210.

Iyer, P.N.S., Wilkinson, K.D. et Goldstein, I.J. An N-acetyl-D-glucosamine binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, Vol. 177, p. 330-333.

Jaffé, W.G. et Seidl, D.S. Toxicology of plant lectins in *Food Poisoning.* New York : Ed° Marcel Dekker, 1992. Vol. 7, p. 263-290.

Janzen, D.H. et Juster, H.B. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in Black Beans on a bruchid beetle. *Science*, 1976, Vol. 192, p. 795-796.

Janzen, D.H., Juster, H.B. et Liener, I.E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*, 1976, Vol. 192, p. 795-796.

Jayne-Williams, D.J. The relationship between the intestinal microflora and the effects of diets containing Raw Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) on the growth of japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).*J. appl. Bact.*, 1972, Vol. 35, p. 331-344.

Jepson, P.C., Croft, B.C. et Pratt, G.E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Mol. Ecol.*, 1994, Vol. 3, N°1, p. 81-89.

Johnson, R., Narvaez, J., An, G.H. et Ryan, C.A. Expression of proteinase inhibitor-I and inhibitor-II in transgenic tobacco plants - Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1989, Vol. 86, N°24, p. 9871-9875.

Jördens-Röttger, D. The role of phenolic substance for host-selection behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Entomol. exp. appl.*, 1979, Vol. 26, p. 49-54.

Jouanin, L., Berthomieu, P., Bonadé-Bottino, M., Pannetier, C., Leplé, J., Chaufaux, J. et Tourneur, J. Utilisation des techniques de génie génétique pour l'obtention de plantes tolérantes aux insectes. *IIème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture*, 1990. Versailles (FR). p. 275-281

Jouanin, L., Brasileiro, A.C.M., Leple, J.C., Pilate, G. et Cornu, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Ann. Sci. Forest.*, 1993, Vol. 50, N°4, p. 325-336.

Kaku, H. et Goldstein, I.J. *Methods in enzymology.* 1989. Snowdrop lectin, Vol. 179, p. 327-331.

Kaku, H. et Goldstein, I.J. Interaction of linear manno-oligosaccharides with three mannose-specific bulb lectins. Comparison with mannose/glucose-binding lectins. *Carbohydr. Res.*, 1992, Vol. 229, p. 337-346.

Kaku, H., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J.M. et Peumans, W.J. New mannose-specific lectins from garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*) bulbs. *Carbohydr. Res.*, 1992, Vol. 229, N°2, p. 347-353.

Kaminski, P.A. *Structure et expression des gènes de lectine de pois*. Thèse de 3ème Cycle : Université Paris VII, 1987.

Kaminski, P.A., Buffard, D. et Strosberg, A.D. The pea lectin gene family contains only one functional gene. *Plant molec. Biol.*, 1987, Vol. 9, N°5, p. 497-507.

Kashlan, N. et Richardson, M. The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of alpha-amylase. *Phytochem.*, 1981, Vol. 20, p. 1781-1784.

King, T.P., Bebgie, R. et Cadenhead, A. Nutritional toxicity of Raw Kidney Beans in pig. Immunocytochemical and cytopathological studies on the gut and the pancreas. *J. Sci. Fd Agric.*, 1983, Vol. 34, p. 1404-1412.

Klinghauf, F.A. Feeding, adaptation and excretion in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 225-254.

Kocourek, J. Historical background in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medecine.* Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J., Acadamic Press Inc., 1986. Vol. p. 3-34.

Konami, Y., Ishida, C., Yamamoto, K., Osawa, T. et Irimura, T. A unique amino acid sequence involved in the putative carbohydrate-binding domain of a legume lectin specific for sialylated carbohydrate chains - primary sequence determination of *Maackia amurensis* hemagglutinin (Mah). *J. Biochem. Tokyo*, 1994, Vol. 115, N°4, p. 767-777.

Koziel, M., Beland, G., Bowman, C., Carozzi, N., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G., Wright, M. et Evola, S. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, Vol. 11, p. 194-200.

Krasnoperov, V.G., Shamotienko, O.G. et Grishin, E.V. A crustaceae-specific neurotoxin from the venom of the *Latrodectus mactans tredecimguttatus* spider. *Bioorg. Khim.*, 1990a, Vol. 16, p. 1567-1569.

Krasnoperov, V.G., Shamotienko, O.G. et Grishin, E.V. Isolation and properties of insectospecific neurotoxins from venom of the *Latrodectus mactans tredecimguttatus* spider. *Bioorg. Khim.*, 1990b, Vol. 16, p. 1138-1140.

Kring, J.B. Flight behaviour of aphid. *Ann. Rev. Entomol.*, 1972, Vol. 17, p. 461-492.

Kumar, M.A., Timm, D.E., Neet, K.E., Owen, W.G., Peumans, W.J. et Rao, A.G. Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 1993, Vol. 268, N°33, p. 25176-25183.

Landry, B.S. La création et le clonage des gènes de résistance aux virus et aux insectes dans les plantes in *La lutte biologique.* Boucherville (Canada) : Ed° Gaëtan Morin, 1992. Chap.24 - p. 451-470.

Lapointe, S.L. et Tingey, W.M. Glandular trichomes of *Solanum neocardenasii* confer resistance to green peach aphid (Homoptera: Aphididae). *J. econ. Entomol.*, 1986, Vol. 79, N°5, p. 1264-1268.

Larocque, A.M. et Houseman, J.G. Effect of ingested soybean, ovomucoid and corn protease inhibitors on digestive processes of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *J. Insect Physiol.*, 1990, Vol. 36, p. 691-697.

Larue-Achagiotis, C., Picard, M. et Louis-Sylvestre, J. Feeding behavior in rats on a complete diet containing Concanavalin A. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1992, Vol. 32, N°4, p. 343-350.

Latgé, J.P. et Papierok, B. Aphid pathogens in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988. Vol. 2B, p. 323-336.

Leclant, F. Les effets nuisibles des pucerons sur les cultures in *Les pucerons des cultures.* Paris : Ed° INRA-ACTA, 1981.Vol. p. 37-56.

Legavre, T. *Vers de nouvelles stratégies de contrôle des Potyvirus : I-Inhibition de la transmission par pucerons, II-Recherche de nouveaux gènes de résistance dérivée du pathogène.* Thèse 3ème Cycle : Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 1993.

Leon, A. *Etude d'une légumineuse tropicale nouvelle pour l'alimentation du poulet (Gallus gallus) : Canavalia ensiformis*. Thèse 3ème Cycle : Paris VI, 1989. 140 p.

Leplé, J.C., Bonadé-Bottino, M., Pilate, G., Augustin, S., Delplanque, A., Dumanoisletan, V., Cornu, D. et Jouanin, L. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera : Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Plant molec. Biol.*, 1995, in press

LeTan-Dumanois, V. *Défense du cotonnier contre les insectes ravageurs : étude d'une stratégie basée sur l'expression conjointe d'inhibiteurs de protéases et de toxines de Bacillus thuringiensis dans la plante*. Thèse de 3ème Cycle : Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 1994. 91p.

Liadouze, I., Febvay, G., Guillaud, J. et Bonnot, G. Effect of diet on the free amino acid pools of symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.*, 1995, Vol. 41, N°1, p. 33-40.

Liang, X., Dron, M., Schmid, J., Dixon, R.A. et Lamb, C.J. Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase β-glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1989, Vol. 86, N°23, p. 9284-9288.

Liener, I.E. Nutritional signifiance of lectins in the diets in *The lectins properties, functions, and applications in biology and medecine*. Orlando (USA) : Irvin E. Liener, Nathan Sharon, Irwin J. Goldstein (Eds), Academic Press, Inc., 1986. p. 527-554.

Liener, I.E., Sharon, N. et Goldstein, I.J. *The lectins properties, functions, and applications in biology and medecine*. Orlando (USA) : Irvin E. Liener, Nathan Sharon, Irwin J. Goldstein (Eds), Academic Press, Inc., 1986. Vol. 560 p.

Lis, H. et Sharon, N. Biological properties of lectins in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medecine.* Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J., Acadamic Press Inc., 1986. p. 266-293.

Lord, J.M., Roberts, L.M. et Robertus, J.D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.*, 1994, Vol. 8, N°2, p. 201-208.

Lorenzsonn, V. et Olsen, W.A. *In vivo* responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology*, 1982, Vol. 82, p. 838-848.

Loris, R., Casset, F., Bouckaert, J., Pletinckx, J., Daothi, M.H., Poortmans, F., Imberty, A., Pérez, S. et Wyns, L. The monosaccharide binding site of lentil lectin: an X-ray and molecular modelling study. *Glycoconjugate J.*, 1994, Vol. 11, N°6, p. 507-517.

Lotan, R., Cacan, R., Cacan, M., Debray, H., Carter, W.G. et Sharon, N. On the presence of two types of subunit in soybean agglutinin. *FEBS L.*, 1975, Vol. 57, p. 100-103.

Lotan, R., Siegelman, H.W., Lis, H. et Sharon, N. Subunit structure of soybean agglutinin. *J. Biol. Chem.*, 1974, Vol. 249, p. 121-124.

Luly, P. et Emmelot, P. Studies on plasma membranes. XXIII-Hormone-like action of Concanavalin a on plasma membranes : inhibition of (Na^+-K^+) ATPase. *Chem. Biol. Interaction*, 1975, Vol. 11, p. 377-385.

Lyon, J.P. Lâchers experimentaux de Chrysopes et d'Hyménoptères parasites sur pucerons en serres d'aubergines. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 1979, Vol. 11, p. 51-65.

Macintosh, S.C., Kishore, G.M., Perlak, F.J., Marrone, P.G., Stone, T.B., Sims, S.R. et Fuchs, R.L. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *J. agric. Food Chem.*, 1990, Vol. 38, N°4, p. 1145-1152.

Maisonneuve, J.C. La lutte biologique sous serre en France en 1992 De nouvelles perspectives après deux ans de tassement. *Phytoma*, 1993, Vol. 452, p. 9-12.

Mäkelä, D. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Biol. Fen.*, 1957, Vol. 35, Suppl. N°11, p. 1-56.

Mallet, J. et Porter, P. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy ? *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1992, Vol. 250, p. 165-169.

Mandal, D.K. et Brewer, C.F. Interactions of Concanavalin-A with glycoproteins: formation of homogeneous glycoprotein-lectin cross-linked complexes in mixed precipitation systems. *Biochemistry*, 1992, Vol. 31, p. 12602-12609.

Marco, Y., Roby, D., Schneider, M. et Toppan, A. Promoteur végétal, microorganismes et cellules végétales contenant une unité d'expression d'une protéine d'intérêt comprenant le dit promoteur. France, N° WO 94/21793. 1994/03/23.

Markkula, M., Tittanen, K., Hamalainen, M. et Forsberg, A. The aphid midge *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera, Cecidomyiidae) and its use in biological control of aphids. *Ann. Ent. Fenn.*, 1979, Vol. 45, p. 89-98.

Masoud, S.A., Johnson, L.B., White, F.F. et Reeck, G.R. Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I) in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.*, 1993, Vol. 21, p. 655-663.

Massonie, G., Monet, R., Bastard, Y. et Maison, P. Heritability in peach of the hypersensitive reaction to the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer in *Sélection pour la résistance aux insectes et aux acariens.* OILB/SROP, 1984.p. 69.

McCown, B., McCabe, D., Russel, D., Robinson, D., Barton, K. et Raffa, K. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance bi electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 1991, Vol. 9, p. 590-594.

McGaughey, W.H. et Whalon, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 1992, Vol. 258, N°5087, p. 1451-1455.

McLean, D.L. et Kinsey, M.G. A technic for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature*, 1964, Vol. 202, p. 1358-1359.

McLean, D.L. et Kinsey, M.G. Identification of electrically recorded curve patterns associated with aphid salivation and ingestion. *Nature*, 1965, Vol. 205, p. 1130-1131.

McLean, D.L. et Kinsey, M.G. Probing behavior of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum. I. Definitive correlation of electronically recorded waveforms with aphid probing activities. *Ann. entomol. Soc. Am.*, 1967, Vol. 60, p. 400-406.

Mehlenbacher, S.A., Plaisted, R.L. et Tingey, W.M. Heritability of trichome density and droplet size in interspecific potato hybrids and relationship to aphid resistance. *Crop Sci.*, 1984, Vol. 24, p. 320-322.

Metcalf, R.L. et Luckman, W.H. *Introduction to insect pest management*. New York : Ed° Wiley, 1982. 2ed, 577 p.

Miles, P.W. Feeding process of Aphidoidea in relation to effects on their food plants in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 321-340.

Miles, P.W. The responses of plants to the feeding of Aphidoidea : principles in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989.Vol. 2C, p. 1-22.

Miles, P.W. Aphid salivary secretions and their involvement in plant toxicoses in *Aphid-plant genotype interactions.* Amsterdam : Campbell, R.K., Eikenbary, R.D., Ed° Elsevier, 1990. p. 131-147.

Miller, R.P. The jackknife - a review. *Biometrika*, 1974, Vol. 61, N°1, p. 1-15.

Mittler, T.E. Applications of artificial feeding techniques for aphids in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2B, p. 145-170.

Miyazaki, M. Forms and morphs of aphids in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 27-50.

Moinet, M.L. L'industrie des prédateurs. *Sc. Vie*, 1994, Vol. 920, p. 80-85.

Montgomery, M.E. et Arn, H. Feeding response of *Aphis pomi*, *Myzus persicae*, and *Amphorophora agathonica* to phlorizin. *J. Insect Physiol.*, 1974, Vol. 20, p. 413-421.

Montgomery, M.E. et Nault, L.R. Comparative response of aphids to the alarm pheromone, (E)-β-farnesene. *Entomol. exp. appl.*, 1977, Vol. 22, p. 236-242.

Müller, F.P. Differential alarm pheromone responses between strains of the aphid *Acyrthosiphon pisum. Entomol. exp. appl.*, 1983, Vol. 34, p. 347-348.

Murdock, L.L., Huesing, J.E., Nielsen, S.S., Pratt, R.C. et Shade, R.E. Biological effects of plant lectins on the Cowpea Weevil. *Phytochemistry*, 1990, Vol. 29, N°1, p. 85-89.

Naberjee, R., Mande, S.C., Ganesh, V., K., D., Dhanaraj, V., Mahanta, S.K., Suguna, K., Surolia, A. et Vijayan, M. Crystal structure of peanut lectin, a protein with a unusual quaternary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, Vol. 91, p. 227-231.

Nakata, S. et Kimura, T. Behavior of ingested Concanavalin A in the gastrointestinal tract of the rat. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, Vol. 50, N°3, p. 645-649.

Nakata, S. et Kimura, T. Concanavalin A-binding glycoprotein fraction in the small intestine and feces of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, Vol. 54, N°1, p. 239-240.

Nardon, P. *Etude des interactions physiologiques et génétiques entre l'hôte et les symbiotes chez le Coléoptère Curculionide* Sitophilus sasakii *(*S. oryzae*)*. Thèse d'état es-sciences naturelles : INSA Lyon, UCB Lyon I, 1978.

Nentwig, W. Spider venoms are not suitable insecticides. *Toxicon*, 1993, Vol. 31, N°3, p. 233-234.

New, T.R. Neuroptera in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988. Vol. 2B, p. 249-258.

Newman, G.R., Jasani, B. et Williams, E.D. The preservation of ultrastructure and antigenicity. *J. Microscopy*, 1982, Vol. 1982, p. 5-6.

Niemeyer, H.M. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry*, 1988, Vol. 27, N°11, p. 3349-3358.

Nijveldt, W. Cecidomyiidae in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988. Vol. 2B, p. 271-278.

Norton, G. Proteinase inhibitors in *Toxic substances in crop plants.* Cambridge : J.P.F. D'Mello, C.M. Duffus & J.H. Duffus (Eds), Ed° R. Soc. Chem., 1991. p. 68-107.

Nottingham, S.F., Hardie, J., Dawson, G.W., Hick, A.J., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. et Woodcock, C.M. Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and non-host plant volatiles. *J. chem. Ecol.*, 1991, Vol. 17, p. 1231-1242.

Novakova, N. et Kocourek, J. Studies on phytohemegglutinins XX Isolation and characterization of hemagglutinins from scarlet runner seeds (*Phaseolus coccineus* L). *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, Vol. 359, p. 320-333.

Nsimba-Lubaki, M., Peumans, W.J. et Allen, A.K. Isolation and characterization of glycoprotein lectins from the dark of three species of elder, *Sambucus ebulus, S. nigra* and *S. racemosa*. *Planta*, 1986, Vol. 168, p. 113-118.

Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J. et Lamb, C.J. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1990, Vol. 2, p. 837-848.

Olsnes, S. et Pihl, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, 1973, Vol. 12, p. 3121-3126.

Olson, M.O. et Liener, I.E. Some physical and chemical properties of Concanavalin A : the phytohemagglutinin of the Jack Bean. *Biochemistry*, 1967, Vol. 6, p. 105-111.

Pang, S.Z., Oberhaus, S.M., Rasmussen, J.L., Knipple, D.C., Bloomquist, J.R., Dean, D.H., Bowman, K.D. et Sanford, J.C. Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plants. *Gene*, 1992, Vol. 116, N°2, p. 165-172.

Pereira, M.E.A., Gruezo, F. et Kabat, E.A. Purification and characterization of Lectin II from *Ulex europaeus* sedds and immunochemical study of its combining site. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, Vol. 194, p. 511-525.

Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. et Fischhoff, D.A. Insect resistant cotton plants. *Biotechnology*, 1990, Vol. 8, p. 939-943.

Perlak, F.J., Stone, T.B., Muskopf, Y.M., Petersen, L.J., Parker, G.B., Mcpherson, S.A., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Biever, D. et Fischhoff, D.A. Genetically improved potatoes - protection from damage by colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.*, 1993, Vol. 22, N°2, p. 313-321.

Peumans, W.J., Allen, A.K., Nsimba-Lubaki, M. et Chrispeels, M.J. Related glycoprotein lectins from root stocks of wild cucumbers. *Phytochemistry*, 1987, Vol. 26, p. 909-912.

Peumans, W.J., De Ley, M. et Broekaert, W.F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS L.*, 1984, Vol. 177, p. 99-103.

Piek, T. Neurotoxins from venoms of the hymenoptera : 25 years of research in Amsterdam. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990, Vol. 96C, p. 223-233.

Pimentel, D. *Some aspects of integrated pest management.* Cornell (USA) : Ed° Cornell University, 1986. Status of integrated pest management.

Pistole, T.G. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1981, Vol. 35, p. 85-112.

Pitrat, M. et Lecoq, H. Relations génétiques entre les résistances par non-acceptation et par antibiose du melon à *Aphis gossypii*. Recherche de liaisons avec d'autres gènes. *Agronomie*, 1982, Vol. 2, p. 503-508.

Ponsen, M.B. *The site of potato leafroll virus multiplication in its vector, Myzus persicae. An anatomy study*. Thèse d'état : Université de Wageningen (NDL), 1972. 147p.

Ponsen, M.B. Alimentary tract in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 79-95.

Poretz, R.D., Riss, H., Timberlake, J.W. et Chien, S. Purification and properties of hemagglutinin from *Sophora japonica*. *Biochemistry*, 1974, Vol. 13, p. 250-256.

Potrykus, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1991, Vol. 42, p. 205-225.

Powell, G., Hardie, J. et Pickett, J.A. Responses of *Myzus persicae* to the repellent polygodial in choice and no-choice video assays with young and mature leaf tissue. *Entomol. exp. appl.*, 1995a, Vol. 74, p. 91-94.

Powell, k. *Antimetabolic effects of plant proteins on homopteran insects pests.* Ph D : Université de Durham (GBR), 1993.

Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. et Gatehouse, J.A. Antimetabolic effects of plants lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two importante rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix nigropictus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, Vol. 66, p. 119-126.

Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. et Gatehouse, J.A. Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Entomol. exp. appl.*, 1995b, Vol. 75, p. 51-59.

Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Boonjawat, J., Horsham, K. et Gatehouse, J.A. Different antimetabolics effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. *Entomol. exp. appl.*, 1995c, Vol. 75, p. 61-65.

Prosser, W.A., Simpson, S.J. et Douglas, A.E. How an aphid symbiosis responds to variation in dietary nitrogen. *J. Insect Physiol.*, 1992, Vol. 38, N°4, p. 301-307.

Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Jennings, M.G., Ryerse, J.S., Pershing, J.C., Sims, S.R., Prinsen, M.J., Corbin, D.R., Tran, M., Sammons, R.D. et Stonard, R.J. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, Vol. 196, N°3, p. 1406-1413.

Purcell, J.P., Isaac, B.G., Tran, M., Sammons, R.D., Gillespie, J.E., Greenplate, J.T., Solsten, R.T., Prinsen, M.J., Pershing, J.C. et Stonard, R.J. Two enzyme classes active in green peach aphid (Homoptera: Aphididae) bioassays. *J. econ. Entomol.*, 1994, Vol. 87, N°1, p. 15-19.

Pusztai, A. Constraints on the nutritional utilization of plant proteins. *Nutr. Abstr. Rew.*, 1985, Vol. 55, p. 363-369.

Pusztai, A. *Plant lectins - Chemistry and pharmacology of natural products*. Cambridge (GBR) : Cambridge University Press, 1991. 253 p.

Pusztai, A., Clarke, E.M.W., Grant, G. et King, T.P. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Fd Agric.*, 1981, Vol. 32, p. 1037-1046.

Pusztai, A., Clarke, E.M.W. et King, T.P. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.*, 1979a, Vol. 38, p. 115-120.

Pusztai, A., Clarke, E.M.W., King, T.P. et Stewart, J.C. Nutritional evaluation of Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Fd Agric.*, 1979b, Vol. 30, p. 843-848.

Pusztai, A., Ewen, S.W.B., Grant, G., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Rubio, L. et Bardocz, S. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*, 1990, suppl. N°2, p. 308-316.

Pusztai, A., Grant, G., Spencer, R.J., Duguid, T.J., Brown, D.S., Ewen, S.W.B., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. et Bardocz, S. Kidney bean lectin-induced *Escherichia coli* overgrowth in the small intestine is blocked by GNA, a mannose-specific lectin. *J. Appl. Bacteriol.*, 1993, Vol. 75, N°4, p. 360-368.

Pusztai, A. et Stewart, J.C. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. Physico-chemical studies. *Biochem. Biophys. Acta*, 1978, Vol. 536, p. 38-49.

Quisenberry, S.S. et Schotzko, D.J. Integration of plant resistance with pest management methods in crop production systems. *J. Agr. Entomol.*, 1994, Vol. 11, N°3, p. 279-290.

Rabasse, J.M. Pucerons en cultures protégées. Les problèmes posés et les moyens de les controler en lutte intégrée. *Déf. Vég.*, 1985, Vol. 234, p. 13-18.

Rabasse, J.M., Dedryver, C.A. et Latge, J.P. Potentialités des Entomophtorales pour la lutte contre les pucerons en serre. 1984, p. 273-277.

Raccaud-Schoeller, J. Le tube digestif : son organisation fonctionnelle in *Les Insectes : physiologie, développement.* Paris : Ed° Masson, 1980. p. 146-166.

Rahbé, Y. et Febvay, G. Effect of certain proteins on *Acyrthosiphon pisum* growth and development. Potential influence on insect-plant relationships. *8th international symposium on insect-plant relationships*, 1992. Wageningen (NDL). p. 301-303

Rahbé, Y. et Febvay, G. Protein toxicity to aphids: an *in vitro* test on *Acyrthosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, Vol. 67, N°2, p. 149-160.

Rahbé, Y., Febvay, G., Delobel, B. et Bonnot, G. Amino acids and proteins as cues in aphid-plant interactions. *XLX international congress of entomology. Symposium on Homopteran feeding behaviour: recent research advances and experimental techniques*, 1992. Beijing.

Rahbé, Y., Febvay, G., Delobel, B. et Bournoville, R. *Acyrthosiphon pisum* performance in response to the sugar and amino acid composition of artificial diets, and its relation to lucerne varietal resistance. *Entomol. exp. appl.*, 1988, Vol. 48, N°3, p. 283-292.

Rahbé, Y., Sauvion, N., Febvay, G., Peumans, W.J. et Gatehouse, A.M.R. Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Entomol. exp. appl.*, 1995, *in press*

Raikhel, N.V., Lee, H.I. et Broekaert, W.F. Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1993, Vol. 44, p. 591-615.

Ramakers, P.M.J. Biological control in greenhouses in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 199-208.

Riba, G. et Silvy, C. *Combattre les ravageurs des cultures - Enjeux et perspectives*. Paris : Ed° INRA, 1989. 230 p.

Riba, G. et Silvy, C. La lutte biologique et les biopesticides. *Phytoma*, 1993, Vol. 452, p. 21-32.

Riggs, C.D., Hunt, D.C., Lin, J. et Chrispeels, M.J. Utilization of luciferase fusion genes to monitor differential regulation of phytohemagglutinin and phaseolin promoters in transgenic tobacco. *Plant Sci.*, 1989, Vol. 63, p. 47-57.

Rini, J.M., Hardman, K.D., Einspahr, H., Suddath, F.L. et Carver, J.P. X-ray crystal structure of the pea lectin-trimannoside complex at 2.6 A resolution. *J. Biol. Mol.*, 1993, Vol. 268, N°14, p. 10126-10132.

Roby, D., Broglie, K., Cressman, R., Biddle, P., Chet, I. et Broglie, R. Activation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungi. *Plant Cell*, 1990, Vol. 2, p. 999-1007.

Roitberg, B.D. et Myers, J.H. Effect of adult Coccinellidae on the spread of a plant virus by an aphid. *J. Appl. Ecol.*, 1978, Vol. 15, p. 775-779.

Rouanet, J.M., Besancon, P. et Lafont, J. Effect of lectins from leguminous seeds on rat duodenal enterokinase activity. *Experientia*, 1983, Vol. 39, p. 1356-1358.

Rougé, P., Richardson, M., Ranfaing, P., Yarwood, A. et Sousa-Cavada, B. Single- and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. *Biochem. System. Ecol.*, 1987, Vol. 15, p. 341-348.

Roush, R.T. et McKenzie, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, 1987, Vol. 32, p. 361-380.

Ruggle, P. et Holst, N. Life history parameters of parasitoids attacking cereal aphids. *Norw. J. Agr. Sc.*, 1994, Suppl. N°16, p. 83-88.

Russel, G.E. Pests-some general considerations in *Plant breeding for pest and disease resistance.* London : Ed° Butterworths, 1981. p. 10-50.

Ryan, C.A. Proteinase inhibitors in *The Biochemistry of Plants.* New York : Marcus, A. (Ed), Academic press, Inc., 1981. Vol. 6, p. 351-370.

Sasaki, T. et Ishikawa, H. Nitrogen recycling in the endosymbiotic system of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Zool. Sci.*, 1993a, Vol. 10, p. 779-785.

Sasaki, T. et Ishikawa, H. Nitrogen recycling in the endosymbiotic system of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Zool. Sci.*, 1993b, Vol. 10, N°5, p. 779-785.

Sawahel, W.A. Transgenics plants: performance, release and containment. *W. J. Microbiol. Biotech.*, 1994, Vol. 10, p. 139-144.

Schepers, A. Chemical control in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed°Elsevier, 1989. Vol. 2C, p. 89-122.

Schmitz, V., Dedryver, C.A. et Pierre, J.S. Influence of an *Erynia neoaphidis* infection on the relative rate of increase of the cereal aphid *Sitobion avenae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1993, Vol. 61, N°1, p. 62-68.

Schoonhoven, L.M. et Derksen-Koppers, I. Effects of some allelochimics on food uptake and survival of polyphagous aphid, *Myzus persicae*. *Entomol. exp. appl.*, 1976, Vol. 19, p. 52-56.

Schumacher, U., Madry, H., Adam, E., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Grant, G., Bardocz, S. et Pusztai, A. Analysis of lectin binding sites in the gut of hooded lister rats with special emphasis on recently detected lectins. *Acta Histochem.*, 1993, Vol. 94, N°2, p. 163-166.

Sciences, A.d. *Les techniques de transgénèse en agriculture - Applications aux animaux et aux végétaux. Académie des Sciences - CADAS - Rapport commun n°2.* Paris : Ed° Lavoisier, 1993. 160 p.

Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V. et Chrispeels, M.J. Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Biotechnology*, 1994, Vol. 12, N°8, p. 793-796.

Shaposhnikov, G.C. Evolution of aphids in relation to evolution of plants in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1987. Vol. 2A, p. 409-414.

Shen, Z.M., Shi, W.X., Sun, C. et Yang, J.T. Conformation and activity of mannose-specific and N-acetylgalactosamine-specific lectins from *Vicia villosa* seeds. *Biochimie*, 1993, Vol. 75, N°11, p. 949-954.

Shi, Y., Wang, M.B., Powell, K.S., Van Damme, E., Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Boulter, D. et Gatehouse, J.A. Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem-specific expression of beta-glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.*, 1994, Vol. 45, N°274, p. 623-631.

Shibuya, N., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J.M. et Peumans, W.J. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis* L) bulb. *J. Biol. Chem.*, 1988a, Vol. 263, N°2, p. 728-734.

Shibuya, N., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J.M. et Peumans, W.J. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J. Biol. Chem.*, 1988b, Vol. 263, N°2, p. 728-734.

Shukle, R.H. et Murdock, L.L. Lipoxygenase, trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Env. Entomol.*, 1983, Vol. 12, N°3, p. 787-791.

Simon, J.C., Dedryver, C.A., Pierre, J.S., Tanguy, S. et Wegorek, P. The influence of clone and morph on the parameters of intrinsic rate of increase in the cereal aphids *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi*. *Entomol. exp. appl.*, 1991, Vol. 58, p. 211-220.

Sjölander, A., Magnussen, K.E. et Latkovic, C. The effect of Concanavalin A and wheat germ agglutinin on the ultrastructure and permeability of rat intestine. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, 1984, Vol. 75, p. 230-236.

Smith, C.M. *Plant resistance to insects: a fundamental approach*. New york : John Wiley & Sons, Ed° Wiley, 1993. 270 p.

Srivastava, P.N. et Auclair, J.L. Characteristics and nature of proteases from the alimentary canal of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harr) (Homoptera: Aphididae). *J. Insect Physiol.*, 1963, Vol. 9, p. 469-474.

Srivastava, P.N. et Auclair, J.L. An improved chemically defined diet for the pea aphid, *Acyrthosyphon pisum*. *Ann. entomol. Soc. Am.*, 1971, Vol. 64, p. 474-478.

Srivastava, P.N., Gao, Y., Levesque, J. et Auclair, J.L. Differences in amino acid requirements between two biotypes of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Can. J. Zool.*, 1985, Vol. 63, N°3, p. 6O3-6O6.

Stary, P. Aphelinidae in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988a. Vol. 2B, p. 185-188.

Stary, P. Aphidiidae in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988b. Vol. 2B, p. 171-184.

Stern, V.M., Smith, R.F., van den Bosch, R. et Hagen, K.S. The integrated control concept. *Hilgardia*, 1959, Vol. 29, p. 81-101.

Strathdee, A.T., Bale, J.S., Hodkinson, I.D., Block, W.C., Webb, N.R. et Coulson, S.J. Identification of three previously unknown morphs of *Acyrthosiphon svalbardicum* Heikinheimo (Hemiptera: Aphididae) on Spitsbergen. *Entomologia scandinava*, 1993, Vol. 24, N°1, p. 43-47.

Strittmatter, G. et Wegener, D. Genetic engineering of disease and pest resistance in plants - present state of the art. *Z. Naturforsch.*, 1993, Vol. 48, N°9-10, p. 673-688.

Strosberg, A.D., Buffard, D., Lauwereys, M. et Foriers, A. Legume lectins: a large family of homologous family in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medecine.* London : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J. (Eds) Acadamic Press Inc., 1986. p. 251-265.

Sylvester, E.S. Virus transmission studies in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988. Vol. 2B, p. 69-82.

Sylvester, E.S. Viruses transmitted by aphids in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1989.Vol. 2C, p. 65-88.

Tazaki, K. et Yoshida, K. The bark lectin of *Robinia pseudoacacia*: purification and partial characterization. *Plant Cell Physiol.*, 1992, Vol. 33, p. 125-129.

Ternynck, T. et Avrameas, S. *Techniques immuno-enzymatiques*. Paris : Soc. Fr. Immunologie, Ed° INSERM, 1991. 108 p.

Tjallingii, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomol. exp. appl.*, 1978a, Vol. 24, p. 521-530.

Tjallingii, W.F. Mechanoreceptors of the aphid labium. *Entomol. exp. appl.*, 1978b, Vol. 24, p. 531-537.

Tjallingii, W.F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol. exp. appl.*, 1985a, Vol. 38, N°2, p. 177-186.

Tjallingii, W.F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol. exp. appl.*, 1985b, Vol. 38, N°2, p. 187-193.

Tjallingii, W.F. *Stylet penetration activities by aphids*. Thèse d'état : Wageninggen (NDL), 1985c.

Tjallingii, W.F. Wire effects on aphids during electrical recording of stylet penetration. *Entomol. exp. appl.*, 1986, Vol. 40, p. 89-98.

Tjallingii, W.F. Stylet penetration activities by aphids : new correlations with electrical penetration graphs in *Insects-Plants.* W. Junk Publishers, 1987.p. 301-306.

Tjallingii, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988a.Vol. 2B, p. 95-108.

Tjallingii, W.F. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids in *Aphid-Plant Genotype interactions.* Amsterdam (NDL) : Elsevier, 1989. p. 1-11.

Tjallingii, W.F. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids in *Aphid-plant genotype interactions.* Amsterdam : R.K. Campbell & R.D. Eikenbary (eds.), Ed° Elsevier, 1990a. p. 89-99.

Tjallingii, W.F. Stylet penetration parameters from aphids in relation to host-plant resistance. *Symp. Biol. Hung.*, 1990b, Vol. 39, p. 411-419.

Tjallingii, W.F. Sieve element acceptance by aphids. *Eur. J. Entomol.*, 1994, Vol. 91, N°1, p. 47-52.

Tjallingii, W.F. et Hogen Esch, T.H. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.*, 1993, Vol. 18, N°3, p. 317-328.

Tjallingii, W.J. Electrical recording of stylet penetration activities in *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam : A.K. Minks & P. Harrewijn, Ed° Elsevier, 1988b. Vol. 2B, p. 95-108.

Ueno, M., Ogawa, H., Matsumoto, I. et Seno, N. A novel mannose-specific and sugar specifically aggregatable lectin from the bark of the japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol. 266, p. 3146-3153.

Usherwood, P.N.R. et Blagbrough, I.S. Spider toxins affecting glutamate receptors : polyamines in therapeutic neurochemistry. *Pharma. ther.*, 1991, Vol. 52, p. 245-268.

Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., Debeuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Vanmontagu, M. et Leemans, J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 1987, Vol. 238, N°2, p. 33-37.

Van Damme, E.J.M., Allen, A.K. et Peumans, W.J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Let.*, 1987, Vol. 215, N°1, p. 140-144.

Van Damme, E.J.M., Allen, A.K. et Peumans, W.J. Related mannose-specific lectins from different species of the family Amaryllidaceae. *Physiol. Plant.*, 1988, Vol. 73, p. 52-57.

Van Damme, E.J.M., Kaku, H., Perini, F., Goldstein, I.J., Peeters, B., Yagi, F., Decock, B. et Peumans, W.J. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L) lectin. *Eur. J. Biochem.*, 1991, Vol. 202, p. 23-30.

Van Damme, E.J.M., Smeets, K. et Peumans, W.J. Chap. 4 - The mannose binding monocot lectins and their genes in *Lectins : biomedical perspectives.* London : Arpad Pusztai and Susan Bardocz (Eds), Ed° Taylor & Francis, 1995.p. 59-90.

Van Damme, E.J.M., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., Goldstein, I.J. et Peumans, W.J. The closely related homomeric and heterodimeric mannose-binding lectins from garlic are encoded by one-domain and 2-domain lectin genes, respectively. *Eur. J. Biochem.*, 1992, Vol. 206, N°2, p. 413-420.

Van der Salm, T., Bosch, D., Honee, G., Feng, L.X., Munsterman, E., Bakker, P., Stiekema, W.J. et Visser, B. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* CRYlA(b) and CRYlC genes: a resistance management strategy. *Plant Mol. Biol.*, 1994, Vol. 26, N°1, p. 51-59.

Van Eijsden, R.R., De Pater, B.S. et Kijne, J.W. Mutational analysis of the sugar-binding site of pea lectin. *Glycoconjugate J.*, 1994, Vol. 11, N°4, p. 375-380.

Van Helden, M. *The resistance of lettuce to the aphid Nasonovia ribisnigri*. Thèse : Université de Wageningen, 1995. 122p.

Vranken, A.M., Van Damme, E.J.M., Allen, A.K. et Peumans, W.J. Purification and properties of an N-acetylgalactosamine specific lectin from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *FEBS Lett.*, 1987, Vol. 216, p. 67-72.

Wang, J.L., Cunningham, B.A. et Edelman, G.M. Unusual fragments in the subunit structure of Concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 1971, Vol. 68, p. 1130-1134.

Wang, M., Boulter, D. et Gatehouse, J. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*. *Plant Molecular Biology*, 1994a, Vol. 24, p. 159-170.

Wang, M.B., Boulter, D. et Gatehouse, J.A. A complete sequence of the rice sucrose synthase-1 (RSs1) gene. *Plant molec. Biol.*, 1992, Vol. 19, p. 881-885.

Wang, P., Hammer, D.A. et Granados, R.R. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *J. Gen. Virol.*, 1994b, Vol. 75, N° Part 8, p. 1961-1967.

Ward, E.R., Ryals, J.A. et Miflin, B.J. Chemical regulation of transgene expression in plants. *Plant Mol. Biol.*, 1993, Vol. 22, p. 361-366.

Wassef, N.M., Richardson, B.G. et Alving, C.R. Specific binding of Concanavalin A to free inositol and liposomes containing phosphatidyl-inositol. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1985, Vol. 130, p. 76-83.

Wilson, A.B., King, T.P., Clarke, E.M. et Pusztai, A. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-induced lesions in rat small intestine: 2 microbiological studies. *J. Comp. Path.*, 1980, Vol. 90, p. 597-602.

Wiseman, B.R. Plant resistance to insects in integrated pest management. *Plant Dis.*, 1994, Vol. 78, N°9, p. 927-932.

Wright, C.S., Gavilanes, F. et Peterson, D.L. Primary structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 peptide order deduced from X-ray structure. *Biochem.*, 1984, Vol. 23, p. 280-287.

Wright, J.P., Fisher, D.B. et Mittler, T.E. Measurement of aphid feeding rates on artificial dits using 3H-inulin. *Entomol. exp. appl.*, 1985, Vol. 37, p. 9-11.

Wyatt, J.T. et White, P.F. Simple estimation of intrinsic increase rates for aphids and tetranychid mites. *J. appl. ecol.*, 1977, Vol. 14, p. 757-766.

Yang, N.S. et Russell, D. Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of GUS gene in transgenic tobacco plants. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, N°11, p. 4144-4148.

Zaccomer, B. *Stratégies pour interférer avec la réplication virale dans des plantes transgéniques : le système modèle du TYMV (Turnip Yellow Mosaic Virus)*. Thèse de 3ème Cycle : Université de Paris Sud, Centre d'Orsay., 1993.

Publications - Communications

Publications :

Bournoville, R., Badenhausser, I., Imwinkelried, J. et Sauvion, N. Multiplication of the lupine aphid on different genotypes of white lupine. *Proceedings 7th International Lupin Conference*, 1990. Temuco, Chile, Nov. 25th-Dec. 2nd. p. 116

Sauvion, N., Bonadé Bottino, M., Jouanin, L. et Rahbé, Y. Les plantes transgéniques résistantes aux insectes. *InfoZoo*, 1995, Vol. 10, p. 3-13

Rahbé, Y., Sauvion, N., Febvay, G., Peumans, W.J. et Gatehouse, A.M.R. Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Entomol. exp. appl.*, 1995,*in press*

Sauvion, N., Rahbé, Y., Peumans, W.J., Van Damme, E., Gatehouse, J.A. et Gatehouse, A.M.R. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the potato-peach aphid *Myzus persicae*. *Entomol. exp. appl.*, 1995, *in press*

Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Rahbe, Y., Newell, C.A., Merryweather, A. et Gatehouse, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid Myzus persicae. *Entomol. exp. appl.*, 1995, *soumis*

Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Rahbé, Y., Newell, C.A., Merryweather, A. et Gatehouse, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. exp. appl.*, 1995, *soumis*

Sauvion, N., Rahbé, Y., Delobel, B., Chen, J.Q. et Febvay, G. Chemical and behavioural characterisation of a resistance in melon to the melon aphid *Aphis gossypii* Glover. *Entomol. exp. appl.*, 1995, in prep

Colloques - Poster :

Febvay, G., Sauvion, N. et Rahbé, Y. A Macintosh program for the analysis of EPGrams: an example to the analysis of melon resistance to *Aphis gossypii*. *XIX International Congress of Entomology*, 1992b. Beijing (CHI) 28/06-04/07 1992.

Febvay, G., Sauvion, N. et Rahbé, Y. Etude d'une résistance du melon au puceron *Aphis gossypii*: aspects comportementaux et méthodes d'analyse (EPG, acquisition informatisée, logiciel d'exploitation des données). *2emes Journées Interactions Plante-Insecte*, 1992. Versailles, 14-15/05/1992.

Sauvion, N., Febvay, G. et Rahbé, Y. Analyse comportementale et biochimique d'une résistance du melon au puceron *Aphis gossypii*: intervention potentielle des protéines phloémiennes. *3eme Journées Interaction Plante-Insecte*, 1993a. Lyon 4-5/06/1993.

Sauvion, N., Febvay, G. et Rahbé, Y. Mécanismes de la toxicité de certaines lectines végétales pour les pucerons (Homoptera / Aphididae) Potentiel d'utilisation de ces toxines protéiques pour la création de plantes transgéniques résistantes aux homoptéres phloémophages. *11eme Colloque de Physiologie de l'Insecte*, 1993. Tours - 16-17/09/1993. p.

Sauvion, N. Mécanismes de la toxicité de certaines lectines végétales pour les pucerons Potentiel d'utilisation de ces toxines protéiques pour la création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. *1er Colloque des Doctorants de l'INSA*, 1994. Villeurbanne - 20/04/94.

Sauvion, N., Febvay, G. et Rahbé, Y. Mécanismes de la toxicité de certaines lectines végétales pour les pucerons. *4emes Journées Interaction Plante-Insecte*, 1994. Renne - 4-5/07/1994.

Rapports :

Sauvion, N. *Etude des caractéristiques de croissance et de multiplication du puceron Macrosiphum albifrons sur différents génotypes de lupins*. Rapport Maîtrise Biophysiologie Appliquée aux Production Végétales : Univers. Sc. Angers, 1989.

Sauvion, N. *Rôle des protéines dans les réactions de défense des plantes aux agressions parasitaires*. rapport bibliographique DEA Anal.yse et Modèl.isation des Systèmes Biologiques : Univers. Sc. Lyon I, 1992.

Sauvion, N. *Analyse comportementale et biochimique d'une résistance du melon au puceron Aphis gossypii: intervention potentielle des protéines phloémiennes*. rapport technique DEA Anal.yse et Modèl.isation des Systèmes Biologiques : Univers. Sc. Lyon I, 1992.

Fiches Protocoles

Fiche N° 1

Origines et élevage des pucerons

Le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* a été initialement introduit dans le Laboratoire de Biologie Appliquée de l'INRA-INSA de Lyon par un échantillon collecté sur luzerne en 1986 (Rahbé *et al.*, 1988). Ce clone (Ap-LLO1) possède les caractéristiques nutritionnelles du biotype nommé "Lusignan" (Srivastava *et al.*, 1985 ; Febvay *et al.*, 1988) et a été appelé LL01. Les pucerons sont élevés sur des jeunes fèves (*Vicia faba*, cv. Aqualduce) à 21°C, en lumière artificielle (16 h jours : 8 heures nuit) et à 60-70 % d'hygrométrie. Les fèves sont utilisées à un âge de 3 à 5 semaines.

Le puceron du pêcher *Myzus persicae* est élevé sur fève dans les mêmes conditions qu'*A. pisum* depuis sept ans. Ce clone (Mp-LB01) est issu d'une fondatrice capturée à l'INRA de Bordeaux sur *Prunus persica* en 1989. Cette souche a été utilisée pour les tests d'intoxication aiguë. Les pucerons ayant servi pour les tests sur plantes transgéniques sont d'une origine différente. Ils ont été fournis au laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Durham par le Scottish Crops Research Institute (Invergowerie, Dundee, UK), et ont été élevés sur chou cv. Chinese.

Macrosiphum albifrons (clone Ma-LL01, fourni par R. Bournoville, INRA Lusignan) a été capturé dans un champ de lupin blanc du Centre de Recherche de Lusignan. Il est élevé sur *Lupinus albus* cv. Lublanc.

Le puceron du melon *Aphis gossypii* (clone Ag-LM01 ; fourni par G. Labonne, INRA Montpellier) est élevé sur melon *Cucumis melo* cv. Védrantais.

Macrosiphum euphorbiae (clone Me-LR01 ; fourni par Y. Robert, INRA Rennes) est élevé sur pomme de terre *Solanum tuberosum* cv. BF15.

Aulacorthum solani (clone As- L01) a été capturé sur des Saint Paulia, en 1993, dans la serre du laboratoire et transféré pour l'élevage sur aubergine cv. Violette de Barentane. Les pucerons que nous avons fournis au laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Durham ont été élevés sur pomme de terre *Solanum tuberosum* cv. Désirée.

Les plantes de culture ainsi que les élevages sont tous placés dans les conditions d'éclairage et d'hygrométrie décrites précédemment.

Fiche N° 2

Références des lectines végétales testées sur pucerons

Origine végétale (ordre alphabétique)	**Abréviations** (d'après EY-Lab)	**Références***
Allium sativum	ASA	*purif.*
Amaranthus caudatus	ACA	*E-L8201*
Arachis hypogaea	PNA	*Σ-L0881*
Artocarpus integrifolia	Jacalin	*Σ-L3515*
Griffonia (=Bandeiraea) simplicifolia	BSII	*Σ-L7508*
Bryonia dioica	BDA	*E-L8002*
Canavalia ensiformis	ConA	*E-L1104*
Cicer arietinum	CPA	*Σ-L3141*
Cytisus scoparius	CSA	*E-L3201*
Erythrina cristagalli	ECA	*Σ-L5390*
Galanthus nivalis	GNA	*purif.*
Glycine max	SBA	*Σ-L1395*
Lens culinaris	LcH	*Σ-L9267*
Maackia amurensis	MAA	*purif.*
Narcissus pseudonarcissus	NPA	*purif.*
Phaseolus coccineus	PCA	*Σ-L3138*
Phaseolus lunatus	LBA	*E-L1701*
Phaseolus vulgaris	PHA	*Σ-L9017*
Pisum sativum	PSA	*Σ-L5380*
Robinia pseudoacacia	RPA	*E-L4101*
Sambucus nigra	SNA1	*purif.*
Sambucus nigra	SNA2	*purif.*
Sophora japonica	SJA	*Σ-L6138*
Trichosanthes kirilowii	TKA	*E-L5600*
Triticum vulgaris	WGA	*Σ-L9640*
Tulipa sp	TL	*purif.*
Ulex europaeus	UEA	*Σ-L6762*
Urtica dioica	UDA	*purif.*
Vicia faba	VFA	*E-L4801*
Vicia villosa	VVAg	*Σ-L4011*
Vicia villosa	VVAm	*E-L4603*

* Σ=Sigma ; E=EY-Laboratories ; purif.= purifiées par Van Damme & Peumans, Université Leuven (Belgique)

Fiche N° 3

Composition du milieu standard Ap2

Ordre		Pds.Mol.	Milieu mM	Qtité pour 100 ml
1	***Saccharose***	**342,3**	**584**	**20000**
2	**L-Amino acides**			**(mg)**
	Alanine	89,09	20,06	178,71
	Béta-Alanine	89,10	0,70	6,22
	Arginine	174,20	14,06	244,90
	Asparagine H20	150,14	19,88	298,55
	Acide Aspartique	133,11	6,63	88,25
	Cystéine	121,16	2,44	29,59
	Acide Glutamique	147,13	10,15	149,36
	Glutamine	146,15	30,49	445,61
	Glycine	75,07	22,19	166,56
	Histidine HCl H2O	209,63	6,49	136,02
	Isoleucine (allo free)	131,18	12,56	164,75
	Leucine	131,18	17,65	231,56
	Lysine HCl	182,65	19,22	351,09
	Méthionine	149,21	4,85	72,35
	Ornithine HCl	168,62	0,56	9,41
	Phénylalanine	165,19	14,04	231,93
	Proline	115,13	11,23	129,33
	Sérine	105,09	11,83	124,28
	Thréonine (allo free)	119,12	10,67	127,16
	Tryptophane	204,23	2,09	42,75
	Tyrosine	181,19	2,13	38,63
	Valine	117,15	16,29	190,85
	B Ala Tyr	288,00	3,79	109,15
	Total		**260**	**3567**
	Rapport Sacch./AA		**2,25**	
3	**Divers**			**(mg)**
	Citrate de Calcium			10,00
	Benzoate de Cholestérol			2,50
	MgSO4 7H20			242,00
4	**Vitamines**			**(mg)**
	Acide p-aminobenzoïque			10,00
	Acide L-Ascorbique			100,00
	Biotine			0,10
	D-Pantothénate de Calcium			5,00
	Chlorure de Choline			50,00
	Acide Folique			1,00
	i-Inositol anhydre			42,00
	Amide Nicotinique			10,00
	Pyridoxine HCl			2,50
	Riboflavine			0,50
	Thiamine HCl			2,50
5	**Métaux traces**		**(mg)**	
	CuSO4 5H20			0,47
	FeCl3 6H2O			4,45
	MnCl2 4H2O			0,65
	NaCl			2,54
	ZnCl2			0,83
6	**KH2PO4**			**250**

pH ajusté à 7,5 avec KOH

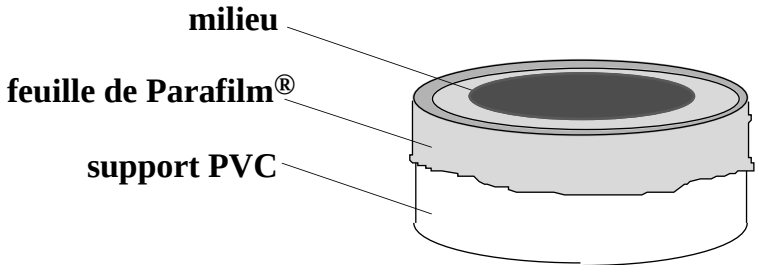
Fiche N° 4

Préparation des milieux Ap2.

Vitamines - Métaux traces - Divers : les solutions de “micro-composants" sont préparées à l'avance. Les vitamines (4), les métaux (5) et autres composés (3) sont pesés avec une microbalance Mettler (modèle AE163, précision ± 10 µg) et dissous dans 150 ml d'eau ultra-pure (solution stock concentrée 5 fois - concentrations finales : fiche-protocole N°3). Après agitation (barreau magnétique, ultra-sons), le volume d'eau est ajusté à 200 ml dans une fiole jaugée. La solution finale est aliquotée dans des flacons de 20 ml. Ils sont conservés à - 20°C jusqu'à trois ou quatre mois. Chaque flacon contient la quantité nécessaire en vitamines pour préparer 100 ml de milieu Ap2.

Le milieu Ap2 final : les acides aminés et le saccharose sont pesés individuellement sur la microbalance Mettler (quantités pour 100 ml - voir fiche-protocole N°3). Ils sont dissous dans 40 ml d'eau ultra-pure plus 20 ml de la solution de vitamines. Après agitation (barreau magnétique, ultra-sons), le pH est amené à 7 avec KOH (5 M). Le KH_2 PO_4 est ajouté et dissous par agitation. Le pH est à nouveau ajusté à 7,5 ; le volume final est ajusté à 100 ml. Il faut alors vérifier que la pression osmotique soit d’environ 1200 mOsM (Febvay *et al.*, 1988), la solution est filtrée à travers un filtre de 0,45 µm (Disposable Filterware, Nalgene®) et stockée par quantités aliquotes de 5 ou 10 ml à -20°C jusqu’à l’utilisation (cinq à six semaines maximum).

Coulage des milieux : les milieux sont décongelés à température ambiante ou par ultra-sons. Après incorporation ou non des protéines à tester, 750 µl de milieux sont coulés en atmosphère stérile entre deux films de Parafilm® tendus sur un support cylindrique (tube de polyvinylchloride (PVC), 35 millimètres de diamètre, 20 millimètres de hauteur (Srivastava et Auclair, 1971). Les "boîtes" ainsi obtenues sont utilisées le jour même, ou stockées à +4°C pour être utilisées le lendemain, ou stockées à -20°C pour une utilisation ultérieure (dans un délai d'un mois) lorsqu’elles ne contiennent pas de protéines ou d’autres composés sensibles à la décongélation.



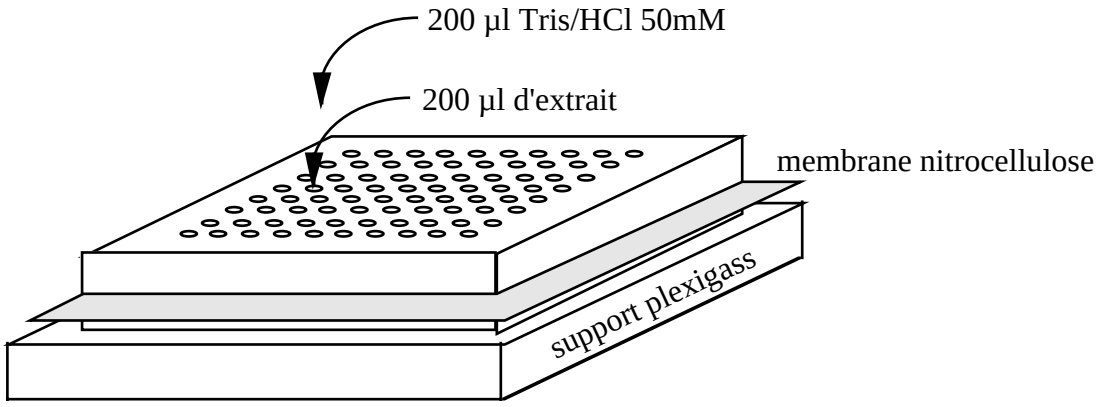
Fiche N° 5

Dosage de la GNA par immunodétection sur membrane de nitrocellulose. Technique par dépôt en tache ("Dot-blot")

Extraction **-** Une feuille est coupée, roulée dans un eppendorf à capuchon percé (préalablement pesé à vide) et plongée dans de l'azote liquide. 2 à 10 feuilles par plante sont ainsi récoltées. Les échantillons sont ensuite lyophilisés et stockés à - 20°C. Les extraits secs sont broyés, pesés et dilués dans un tampon Tris/HCl (50 mM, pH=9,5, contenant 1% d'une solution de PMSF[1] dans de l'éthanol à 36 $mg.ml^{-1}$) à raison de 1ml de tampon pour 10 mg de poudre. L'ensemble est laissé sous agitation à +4°C pendant une nuit. Après centrifugation (11000 rpm, 5 min, +4°C), 800 à 900 µl de surnageant sont récupérés et stockés à -20°C.

Un dosage des protéines totales des extraits est réalisé suivant la technique de Bradford (Fiche-Protocole N°6). La concentration moyenne des extraits a été estimée à 5 µg de protéines par 9,5 µl d'échantillon. Une gamme témoin de GNA (0 à 2 %) est préparée à partir d'une solution mère de GNA à 5 $ng.\mu l^{-1}$. Chaque extrait témoin contient de la GNA (% défini - gamme 0-2 % des protéines totales) + 9,5 µl (5 µg) d'extrait d'un échantillon témoin.

Dépôt ("Blotting") **-** 200 µl par extrait sont déposés sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du dispositif suivant :

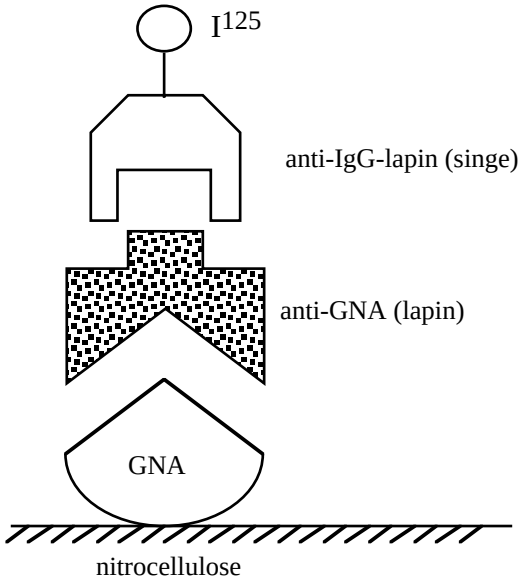


Après dépôt, la membrane est saturée dans du BLOTTO (Tris/HCl 20 mM, pH= 7,2 ; 0,9% NaCl (= TN), contenant 5% de lait écrémé) pendant une nuit à +4°C.

[1] PMSF Phényl-méthyl-Sulfonyl Fluoride - inhibiteurs de protéases

Incubation ("Probing") - L'anticorps anti-GNA (sérum de lapin) est dilué au 1:5000ème dans 20 ml de TN. La membrane est laissée à incuber pendant 2h sous agitation à 37°C. On procède ensuite à trois rinçages, de 10 min chacun, dans du BLOTTO.

Une solution d'anticorps (sérum de singe) anti-lapin greffé à de l'iode-I^{125} (solution à 10 µCi) est diluée dans 40 ml de TN. La membrane est laissée à incuber dans cette solution 2h à 37°C sous agitation. Après trois lavages comme précédemment et un rinçage dans du TN, la membrane est séchée. Dans une chambre noire, elle est placée entre deux feuilles de Saran® Wrap. On expose enfin un film autoradiographique[2] sur la membrane après l'avoir "flashée". L'exposition peut s'échelonner entre 2 heures et 2 jours, suivant les dépôts.



- Les films sont “scannés” sur un densitomètre LKB Ultrascan XL. Les densités de coloration des taches correspondant aux dépôts des extraits de feuilles de plantes transformées sont comparées à celles des taches de la gamme témoin pour estimer les concentrations en GNA ; celles-ci sont *in fine* exprimées en % des protéines solubles totales.

[2] "Blue-sensitive X-Ray film"

Fiche N° 6

Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

Principe : le colorant utilisé, le bleu de Coomassie, se fixe aux protéines par liaisons électrostatiques en milieu hydroalcoolique acide. L'interaction colorant-protéine provoque une modification des maxima d'absorption du bleu de Coomassie (465 nm -rouge- à 595 nm -bleu-) dépendante de l'affinité de la protéine pour le colorant, affinité assez fortement liée à la taille de la protéine (les protéines de masses moléculaires inférieures à 20 kDa ont une faible affinité pour le bleu de Coomassie).

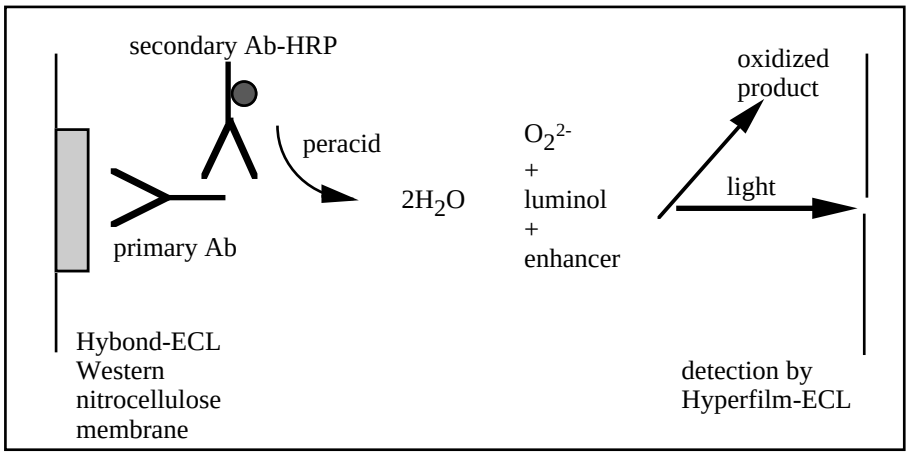
Préparation du colorant : le bleu de Coomassie (Brillant Blue G 250-Sigma) est dissous à raison de 100 mg pour 50 ml d'alcool éthylique à 95 %. Ajouter 100 ml d'acide ortho-phosphorique RP 85 % (Merck) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée. Après une nuit de repos à +4°C, le réactif est filtré sur papier, puis conservé à l'obscurité à +4°C.

Mode opératoire : la protéine utilisée pour établir les gammes étalons est la sérum albumine bovine (BSA) exempte d'acides gras (fraction V, Sigma). La gamme étalon est réalisée avec des quantités de BSA allant de 2 à 20 µg. Cette gamme est refaite pour chaque solution de Bradford préparée. 50 µl de soude 1M sont ajoutés à 20 µl de l'échantillon protéique. 1 ml de bleu de Coomassie est ensuite ajouté au tube, incubé pendant 5 min à température ambiante. La densité optique est lue à 595 nm.

Fiche N° 7

Détection de la GNA dans des feuilles de pomme de terre par chimioluminescence (Enhanced Luminescence Detection - "ECL Tissue Blot")

Principe : la GNA est captée dans un premier temps par un anticorps primaire. Le complexe formé est capturé dans un second temps par un anticorps secondaire couplé à de la peroxidase. La GNA est révélée par ajout d'une solution contenant du luminol : la peroxidase catalyse la réaction d'oxydation de ce composé qui se traduit par une émission de lumière. Après amplification (x 1000), celle-ci est révélée sur un film photosensible :



Solutions :

- une solution stock de PBS (phosphate buffered saline solution) concentrée 10 fois est préparée et conservée en chambre froide :

KH_2PO_4	2g
Na_2HPO_4	11,5g
KCl	2g
Nacl	80

H_2O qsq 1000 ml

- tampon PBS -Tween-lait : (= tampon de blocage et de dilution de l'antisérum)

Lait écrémé	50g
PBS (x10)	100 ml
Tween 20	10 ml

H_2O qsq 1000 ml

Dépôt : 5 à 6 feuilles sont prélevées à différents niveaux sur une plante et coupées en deux perpendiculairement à la nervure centrale avec une lame de rasoir (une lame neuve par plante). Les deux extrémités vives sont appliquées sur une membrane nitrocellulose, en pincant la feuille.

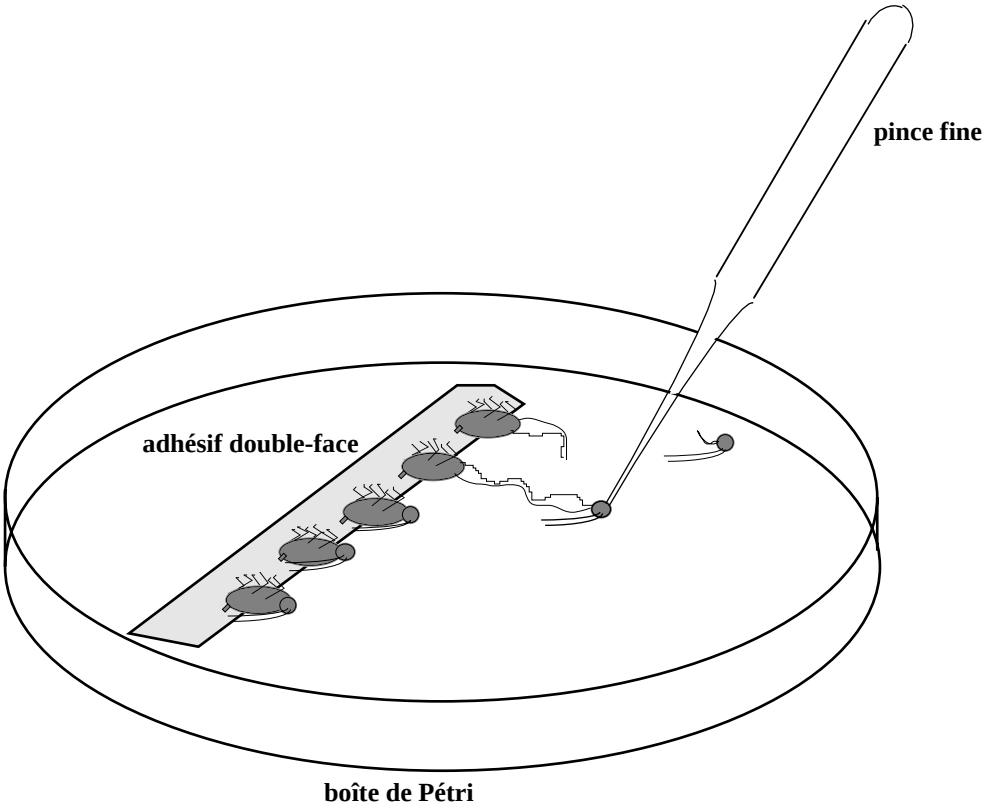
Incubation : la membrane de nitrocellulose est mise à incuber dans le tampon PBS-Tween-lait, sous agitation, 1 h à température ambiante ou toute la nuit à +4°C. Elle est ensuite mise à incuber avec la solution contenant l'anticorps primaire (GNA 2-2, anticorps monoclonal anti-GNA, sérum de lapin, dilué au 1:10000) pendant 2 h à température ambiante (ou toute une nuit à + 4°C), sous agitation. Après trois lavages de cinq minutes dans le tampon PBS-Tween-lait, la membrane est incubée dans la solution contenant l'anticorps secondaire (anti-lapin-IgG couplé à une peroxidase HRP (Horseradish peroxidase), sérum de chèvre (de Biorad) dilué au 1:10000) pendant 1h30 à température ambiante (ou une nuit à + 4°C). La membrane est lavée deux fois 5 min et une fois 15 min dans du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20. Elle est enfin rincée deux fois dans de l'eau pour éliminer le Tween (qui inhibe l'activité de la HRP) puis est stockée dans de l'eau.

Révélation : nous avons utilisé le kit de révélation ECL d'Amersham. Dans une chambre noire, un volume de solution 1 est mélangé à un volume de solution 2 (à raison de 0,125 $ml.cm^{-2}$ de nitrocellulose). Le réactif est versé directement sur la membrane après élimination soigneuse de la dernière solution de rinçage. Après 1 min exactement d'incubation à température ambiante, le réactif est éliminé, la membrane est séchée puis placée entre deux feuilles de Saran® Wrap. Un film autoradiographique[3] est exposé sur la membrane pendant 15 sec. En fonction du résultat obtenu, d'autres expositions sont réalisées pendant une à plusieurs minutes (le pic de lumière se produit entre 5 et 20 min). Après exposition, chaque film est immédiatement développé et fixé.

[3] “Blue sensitive X-ray film”

Fiche N° 8

Dissection des tubes digestifs de pucerons



-1) les pucerons vivants sont fixés dans une boîte de Pétri sur un adhésif double face ;
-2) ils sont recouverts de tampon physiologique (Yeager) ;
-3) extraction du tube digestif : la tête est arrachée, tout le tube digestif est étiré, l'oesophage est coupé juste au-dessus de l'estomac, l'intestin est coupé avant la grande poche du rectum. A ce stade, l'estomac et l'intestin sont éventuellement séparés. A l'aide d'une pince fine, ils sont transférés avec précaution dans les solutions adéquates pour leur utilisation future.

Fiche N° 9A

Dosage spécifique de la ConA par une méthode immunoenzymatique quantitative, l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Nous avons appliqué un dosage de type non compétitif dit en “sandwich". C'est le procédé qui donne en effet les résultats les plus satisfaisants, aussi bien du point de vue de la sensibilité que de la reproductibilité.

Principe de la méthode : selon cette méthode, l'antigène à doser est capté dans un premier temps par l'anticorps spécifique préalablement immobilisé sur un support (anticorps primaire ; figure page suivante). La quantité d'antigène complexé est mesurée, dans un deuxième temps, après sa réaction avec un anticorps de même spécificité couplé à une enzyme, ou par un anticorps biotinylé (anticorps secondaire). Ce dosage suppose que l'antigène possède plusieurs épitopes (identiques ou non), de façon qu'après sa réaction avec l'anticorps immobilisé, il puisse encore réagir avec l'anticorps secondaire. L'activité enzymatique obtenue est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée par l'anticorps primaire.

Utilisation du système biotine-avidine : la forte interaction entre la biotine et l'avidine a été à la base du développement de nouveaux réactifs pouvant se substituer aux conjugués anticorps-enzymes. La biotine est un haptène facilement couplable aux groupements aminés des protéines et qui n'altère que peu ou pas les propriétés immunologiques ou enzymatiques de ces protéines. C'est ainsi que des anticorps biotinylés peuvent réagir avec l'antigène homologue, et le complexe antigène-anticorps-biotine formé peut être ensuite révélé par le procédé BRAB par exemple ("Bridged-avidin-biotin"). Ce procédé consiste à utiliser l'avidine comme pont entre l'anticorps et l'enzyme, tous deux biotinylés, et permet donc une amplification par ce biais.

Méthodologie :

A préparer le jour même du test (pour une plaque) :

- Gélatine 5 % ; à dissoudre au bain-marie bouillant
- PBS : un litre ; 5 comprimés
- PBS-gélatine : ajouter 1,2 ml de gélatine 5 % à 10,8 ml de PBS
- PBS-Tween : ajouter 1ml de Tween 20 à 1 litre de PBS

NB: la solution de PBS-Tween ne se garde pas plus d’une nuit à +4°C

- PBS-Tween-gélatine : ajouter 1,2 ml de gélatine 5 % à 10,8 ml de PBS-Tween

- tampon carbonate bicarbonate 0,1 M pH=9,5 : 15 ml, diluer 10 fois le tampon stock 1M.

Réactifs :

- *anticorps de capture :* anticorps de lapin (fraction = Ig G primaires) anti-ConA (réf. Sigma-C7401 ; titre 15/8 : 1,875 mg/ml d'antisérum avec 1 mg/ml ConA).

- *anticorps biotinylé :* anticorps de chèvre anti-ConA (réf. Vector BA-0004).

- *avidine* (réf. Pierce #21121X)

- *peroxidase biotinylée :*(réf. Pierce #29139X)

Tous ces réactifs ont été reçus sous forme de poudre pure lyophilisée. Ils ont été repris dans de l'eau ultra-pure et aliquotés, de manière à avoir des aliquotes de 100 µl contenant la quantité nécessaire de réactifs pour une plaque. Ces aliquotes sont conservées à - 20°C.

- *antigène :* ConA (réf. EY-Laboratories L1104)

- *substrat peroxydase :* kit solutions "TMB Peroxydase Substrate" et "Peroxydase Solution B" = TMB Microwell Peroxydase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc ; # 50-76-00).

Matériel :

-*microplaques de titration* en polystyrène-96 trous (réf. Immulon 3 #011-010-3750, DYNATECH Laboratories).

- *lecteur de plaques* (réf. AXIA MicroReader-Biomérieux #98-120 ; photomètre automatique, photométrie à faisceau vertical).

- *pipettes multicanaux* (labsystems-Finnpipette Digital MCP 50-300 µl, #4142417, 8 trous).

Solutions stocks :

- *Tween 20* (polyoxyéthylènesorbitan monolaurate, réf. Sigma P1379)

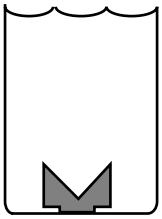
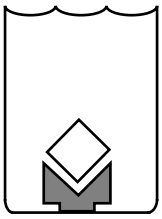
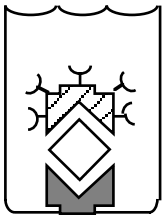
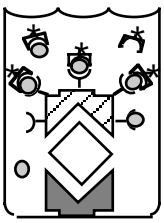
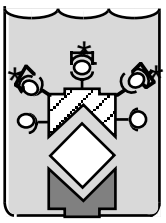
- *tampon phosphate salin* (PBS) (réf. Sigma-P4417) vendu sous forme de cachet : dissoudre 1 cachet par 200 ml d'eau pure, donne un tampon : 0,01 M tampon phosphate, 0,0027 M Chloride de Potassium 2,7 mM, pH=7,4 à 25°C. Solution stockée à + 4°C.

- *gélatine à 5%* : 25 g de gélatine dissous dans 500 ml d'eau distillée par chauffage à ébullition répartis en flacons stériles et garder à + 4°C,

- *tampon carbonate-bicarbonate 1 M , pH = 9,5 :* dissoudre 35 g de carbonate de sodium (ou 95 g de carbonate de sodium, 10 H_2O) et 56 g de bicarbonate de sodium dans 800 ml d'eau distillée et compléter le volume à 1 litre, stocker à + 4°C.

Fiche N° 9B

Dosage de la ConA par ELISA - Procédé BRAB

Etape 1  **Sensibilisation** de la plaque avec l'anticorps primaire (αConA) dilué à 5 µg.ml^{-1} dans le Tampon C/biC	- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque, - Recouvrir la plaque d'une feuille autocollante, - Incuber ***30 min à 37° C***. - Vider la plaque, laver 1 fois avec du PBS-Tween
Saturation	- Saturer les sites de la plaque avec 100 µl de la solution PBS-gélatine, pendant ***30 min à 37°C***. - Rincer 3 fois avec du PBS-Tween
Etape 2  **Incubation** de la ConA gamme : 5 ng.ml^{-1} à 500 ng.ml^{-1}	- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque : + gamme de ConA dans PBS-Tween-gélatine + échantillons secs, repris dans le PBS-Tween-gélatine - Recouvrir et incuber ***30 min à 37° C***. - Rincer 5 fois avec du PBS-Tween
Etape 3  **Incubation** du conjugué anticorps secondaire biotinylé (αConA) dilué à 1 µg.ml^{-1} dans PBS-Tween-gélatine	- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque - Recouvrir et incuber ***1 h à 37° C***. - Rincer 5 fois avec du PBS-Tween
Etape 4 **Révélation :**  Addition de l'**avidine** dilué à 0,1 µg.ml^{-1} dans PBS-Tween-gélatine	- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque, - Recouvrir et incuber ***1 h à température ambiante*** - Vider la plaque, laver 5 fois avec du PBS-Tween
Addition de la **peroxydase biotinylée** dilué à 0,1 µg.ml^{-1} dans PBS-Tween-gélatine	- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque, - Recouvrir et incuber ***1 h à température ambiante*** - Vider la plaque, laver 5 fois avec du PBS-Tween
 Coloration **TMB**	- Déposer rapidement 100 µl / puits de la solution substrat TMB fraîchement préparée, - Incuber à température ambiante, 10 à 30 min - **Sans arrêter** la réaction, lire l'absorbance à 640 nm, de 2 min en 2 min.

remarque : comme pour toutes méthodes immunoenzymatiques, ce dosage a été optimisé en trouvant pour chaque étape, le meilleur temps d'incubation et la meilleure concentration de l'anticorps primaire, du conjugué, de l'avidine et de la peroxydase biotinylée.

Fiche N° 10A

Dosage spécifique de la GNA par une méthode immunoenzymatique quantitative, l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Nous avons appliqué une méthode indirecte du dosage de la GNA[4] dans des extraits de tubes digestifs de pucerons. C'est la méthode adaptée au Laboratoire de Biologie Moléculaire de Durham. Elle est moins sensible que le dosage de type “sandwich" (fiche-protocole N° 9A), mais l'utilisation de deux anticorps permet cependant une bonne amplification.

Principe de la méthode :

Dans un premier temps, l'antigène est immobilisé sur un support, il est ensuite capté par un premier anticorps spécifique (anticorps primaire, réf. "Rabbit 2, 2nd bleed" Lab. Biol. Mol. Durham). Dans un deuxième temps, la quantité de GNA complexée est mesurée après la réaction de l'anticorps primaire avec un second anticorps couplé à la peroxydase (anticorps de chèvre anti IgG de lapin, Réf. Lab. Biol. Mol. Durham).

L'activité enzymatique obtenue est proportionnelle à la quantité d'anticorps primaire complexée à la GNA.

Matériel & solutions :

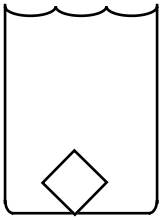
Le matériel utilisé à Durham est sensiblement le même que celui décrit dans la fiche-protocole N°9B. Les solutions sont également identiques, à ceci près, que la gélatine est remplacée par de la BSA. Pour notre dosage, l'utilisation de l'un ou l'autre de ces milieux de saturation n'a pas d'importance (Ternynch et Avrameas, 1991). La fiche-protocole N°10B décrit en détail la procédure appliquée.

[4]réf. Vector L1240, stockée à + 4°C

Fiche N° 10B

Méthode indirecte de dosage de la GNA par ELISA
(protocole Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)

Etape 1



Incubation de la GNA

- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque :
  + gamme de GNA dans le "Coating Buffer"
  + échantillons secs, repris dans le même tampon
- Recouvrir et incuber ***1 h à température ambiante.***

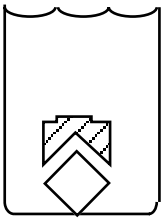
- Vider la plaque, laver 1 fois avec la "Wash Solution"

Saturation

- Saturer les sites de la plaque avec 250 µl de la "BSA Diluent/Blocking Solution", pendant ***5 min à température ambiante.***

- Rincer 3 fois avec la "Wash Solution"

Etape 2



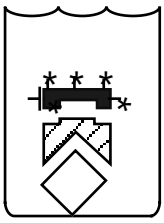
Incubation de l'anticorps primaire (sérum lapin : αGNA)

dilué à 1:2000 dans la "BSA Diluent/Blocking Solution"

- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque
- Recouvrir et incuber ***1 h à température ambiante.***

- Rincer 5 fois

Etape 3



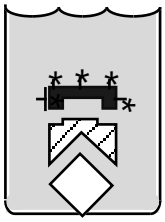
Incubation de l'anticorps secondaire (sérum chèvre : αIgG-Lapin) - couplé à la peroxydase

dilué à 1:3000 dans "BSA Diluent/Blocking Solution"

- Déposer 100 µl / puits selon le plan de plaque
- Recouvrir et incuber ***1 h à température ambiante.***

- Rincer 5 fois

Etape 4



Révélation : coloration **ABTS**

- Déposer rapidement 100 µl / puits de la solution substrat ABTS fraîchement préparée,
- Incuber à température ambiante, 10 à 30 min
- **Sans arrêter** la réaction, lire l'absorbance à 405 nm, de 2 min en 2 min.

remarque : la fiche technique de Kirkegaard & Perry Laboratories, ne donne pas la composition des différentes solutions. Elle indique simplement que la "Wash Solution" et la "BSA Diluent/Blocking Solution" contiennent du Tween 20. Nous avons cependant supposé que les différentes solutions sont sensiblement identiques à celles utilisées dans le protocole ELISA-ConA.

Fiche N° 11

Ajustement des données d'inhibition de croissance des pucerons au modèle de Michaelis-Menten

L'équation régissant le modèle de Michaelis-Menten est la suivante :

$$y = C + \frac{P_1 . x}{P_2 + x}$$

x : concentration en lectine

y : masse moyenne des pucerons

C : masse moyenne des pucerons sur les milieux témoins sans lectine (utilisée en constante, et non en paramètre)

P_1 : inhibition théorique maximale

(quand $x \to \infty$, $y = C + P_1$)

P_2 : concentration pour laquelle IC = 50 % de l'inhibition théorique maximale.

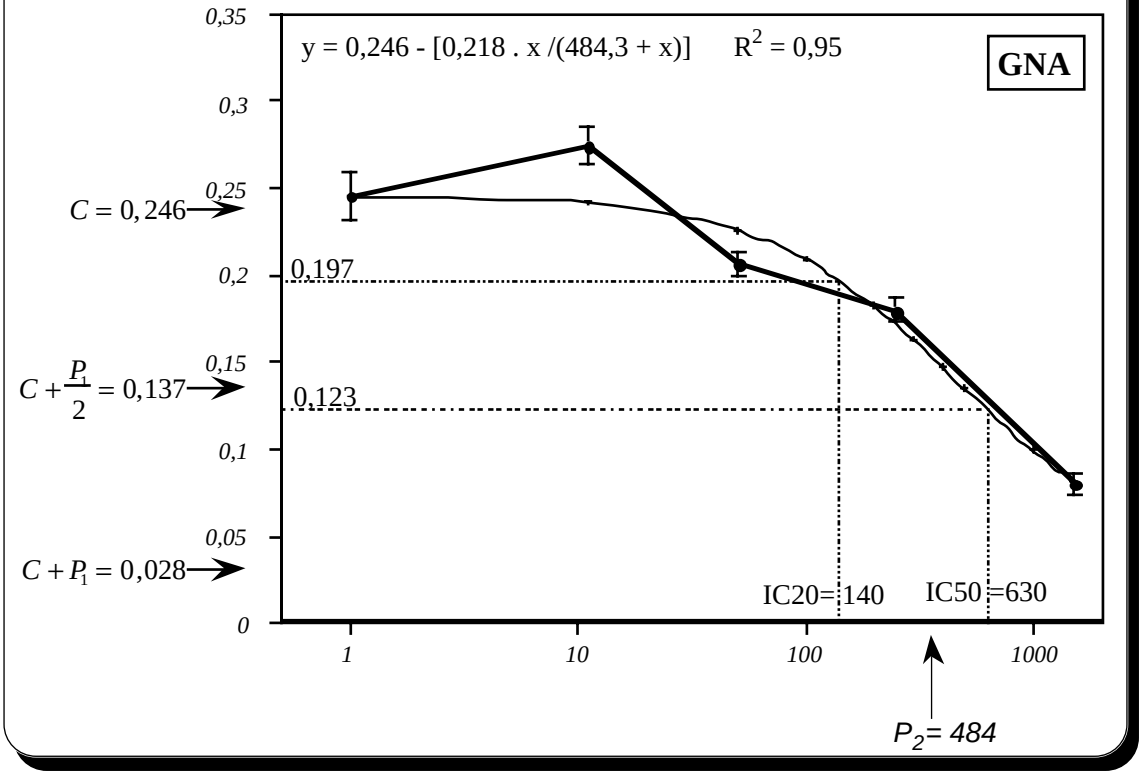
(quand $x = P_2$, $y = C + \frac{P_1}{2}$)

Les concentrations inhibitrices 20 et 50 (conduisant à des insectes 20 % et 50 % plus petits que les témoins) sont déduites de ce modèle. Elles sont données par les formules :

$$IC20 = -\frac{P_2 . C}{5 . P_1 + C}$$

$$IC50 = -\frac{P_2 . C}{2 . P_1 + C}$$

Exemple de l'intoxication de *M. persicae* par la GNA



Fiche N° 12

Définition du taux intrinsèque d'accroissement naturel (r_m) d'une population de pucerons

---

On appelle taux intrinsèque d'accroissement naturel, le taux d'accroissement par individu dans des conditions déterminées (de températures, d'humidité relatives, etc) et dans un milieu illimité où les effets d'augmentation de densité ne peuvent se faire sentir. Ce taux représenté par le symbole "r_m" (ou "r" pour certains auteurs) est encore appelé paramètre de Malthus, capacité innée d'accroissement en nombre, taux ultime d'accroissement, etc...

D'après le modèle de Lotka (1925 cité par Dajoz, 1974), dans une population à croissance exponentielle, si l'on désigne l'effectif par N et le temps par t, nous avons la relation :

$$\frac{dN}{dt} = r_m . N \text{, d'où en intégrant } N_{(t)} = N_0 . e^{r_m . t}$$

$N_{(t)}$ étant l'effectif au temps t, et N_0 au temps zéro.

L'unité du r_m = unité de taux d'accroissement = nombre de femelles / femelle / unité de temps (généralement le jour).

Remarque : dans un certain nombre de cas, il peut être plus facile ou plus utile de calculer le coefficient d'accroissement λ pour une unité de temps déterminée : jour, semaine, année. On utilise alors la relation :

$$\frac{N_{(t+1)}}{N_{(t)}} = e^{r_m} = \lambda$$

D'abord utilisé dans le cas de populations humaines, le taux intrinsèque d'accroissement naturel a ensuite été employé pour l'étude des insectes (Birch, 1948), des rongeurs et diverses autres espèces animales (pour revue, Dajoz, 1974). L'expression de r_m n'a de valeur que si le modèle exponentiel de croissance de la population n'est pas trop éloigné de la réalité, ce qui explique que l'application est restreinte aux insectes plurivoltins à générations courtes et chevauchantes, par exemple aux drosophiles et aux pucerons.

L'intérêt du $\mathbf{r_m}$ est donc de permettre d'exprimer la **vitesse de croissance** d'une population aphidienne, et de **comparer différentes populations** dans des conditions déterminées. Dans notre cas, nous avons comparé des populations d'une même espèce soumises à différentes conditions d'alimentation (pucerons sur plantes transgéniques ou milieux artificiels).

L'évolution d'une population peut être assimilée à une exponentielle (Rabasse & Shalaby, 1980 ; Dixon, 1987) ; il y a au bout d'un certain temps une distribution stable des âges*. On peut alors appliquer la relation définie par Lotka :

$$\int_0^{\infty} e^{-r_m.x}.l_x.m_x.d_x = 1$$

(x, m_x et l_x sont définis dans le "matériels & méthodes" - Chapitre 2)

Nous avons vu que lorsque r_m n'est pas trop grand il est possible d'utiliser l'approximation de Birch (1948) tel que :

$$\sum_0^n e^{-r_m.x}.l_x.m_x.d_x = 1$$

le r_m de chaque population est calculé par approximations successives (itérations) sur cette formule à l'aide d'une feuille de calcul Excel permettant de chercher à encadrer la valeur 1 en faisant varier la valeur r_m de façon discrète.

* On démontre que dans une population de pucerons qui atteint une distribution stable des âges, les adultes ne constituent qu'une très faible proportion du total ; la majorité des individus est constituée par des jeunes larves.

Fiche N° 13

Principe de la méthode du Jackknife pour estimer la variance du r_m d'une population de pucerons

---

La méthode de Jackknife a été introduite par Quenouille en 1949 (cité par Miller, 1974). Elle permet une estimation de la variance de tout paramètre lié à un échantillon en réduisant le biais lié à la répartition des aléatoires. Le principe de la méthode est décrit ici en nous appuyant sur notre exemple concret du calcul de la variance du r_m d'une population de pucerons. Un aspect plus théorique et général de la méthode est détaillé par Miller (1974) et Efron (1982).

Nous souhaitons estimer la valeur du r_m d'une population de pucerons, ainsi que l'intervalle de confiance de cette estimation sur un échantillon de n pucerons. La méthode classique nous aurait conduit à utiliser les r_m calculés pour chaque individu ou r_{mi} et nous aurions obtenu dans le cas d'une distribution normale des r_{mi} :

$$r_m = \bar{r}_m \pm t_{n,\alpha=0,05} . \sigma_{(r_m)}$$

avec $$\bar{r}_m = \frac{1}{n} \sum r_{mi}$$

$$\sigma_{(r_m)} = SD = \left[\frac{n-1}{n} . \sum (r_{mi} - \bar{r}_m)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Mais dans notre cas, le calcul des r_m individuels est imprécis pour des raisons intrinsèques liées à la formulation du calcul (voir fiche-protocole N°12). Par exemple, avec un puceron, la probabilité de survie l_x est 1 ou 0.

Selon la méthode du Jackknife, il est possible de déterminer la variance du r_m sans utiliser les r_{mi} , mais au contraire des groupes de pucerons privés d'un individu i :

soit $r_{m(i)}$ le r_m calculé à partir de l'échantillon privé de l'individu i, on obtient :

$$r_{m(.)} = \frac{1}{n} \sum r_{m(i)}$$

et $$\sigma_{(r_{m(.)})} = SD_{Jack} = \left[\frac{n-1}{n} . \sum (r_{m(i)} - \bar{r}_{m(.)})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$ Efron (1982)

Fiche N° 14A

Modélisation de la dynamique de ponte des pucerons (Guy Bonnot, communication personnelle)

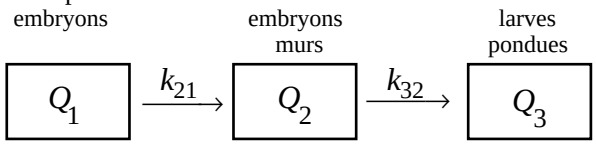
Hypothèse de base :

1)- un puceron (ou une population de pucerons) au début de la vie reproductive (soit T_0) dispose d'un stock initial d'embryons N_0,

2)- ce pool d'embryons subit une **maturation proportionnelle au nombre d'embryons** : k_{21} = **constante de vitesse** de maturation des embryons,

3)- les embryons sont pondus avec une **constante de vitesse** k_{32}.

On a ainsi le schéma de compartimentation suivant :



Au temps t = T_0 : $Q_1 = N_0$ $Q_2 = 0$ $Q_3 = 0$

Soit : $$\frac{dQ_1}{dt} = -k_{21}.Q_1 \qquad (1)$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = k_{21}.Q_1 - k_{32}.Q_2 \qquad (2)$$

$$\frac{dQ_3}{dt} = k_{32}.Q_2$$ (3) : qui définit la ponte par unité de temps (nombre de larves pondues / jour)

$\frac{dQ_1}{dt} = -k_{21}.Q_1$ a pour solution $Q_1 = C_1.e^{-k_{21}.t}$, et par passage aux conditions initiales on calcule la constante C_1 :

$$Q_{1(T_0)} = N_0 = C_1.e^{-k_{21}.T_0}$$

d'où :

$$C_1 = N_0.e^{k_{21}.T_0}$$

et

$$Q_{1(t)} = N_0.e^{k_{21}.T_0}.e^{-k_{21}.t}$$

$$Q_{1(t)} = N_0.e^{-k_{21}.(t-T_0)} \qquad (4)$$

Pour simplifier cette écriture posons : $T = t - T_0$

$$Q_{1(t)} = N_0.e^{-k_{21}.T} \qquad (5)$$

d'après (2) on a :

$$\frac{dQ_2}{dt} = -k_{32}.Q_2 + k_{21}.\left[N_0.e^{-k_{21}.T}\right] \qquad (6)$$

en postulant que la solution de cette équation soit de la forme :

$$Q_{2(T)} = C_{2(T)}.e^{-k_{32}.T} \qquad (6')$$

on obtient :

$$\frac{dQ_2}{dT} = -k_{32}.Q_2 + \frac{dC_2}{dT}.e^{-k_{32}.T} \qquad (7)$$

En identifiant membre à membre (6) et (7) on obtient :

$$\frac{dC_2}{dT}.e^{-k_{32}.T} = k_{21}.\left[N_0.e^{-k_{21}.T}\right]$$

soit $\frac{dC_2}{dT} = k_{21}.N_0.e^{(k_{32}-k_{21}).T}$

soit $C_{2(T)} = \frac{k_{21}.N_0}{k_{32}-k_{21}}.e^{(k_{32}-k_{21}).T} + A$

et donc $Q_{2(T)} = \frac{k_{21}.N_0}{k_{32}-k_{21}}.e^{(k_{32}-k_{21}).T}.e^{-k_{32}.T} + A.e^{-k_{32}.T} \qquad (8)$

si $T = 0$ alors $t = T_0$ et $Q_{2(0)} = 0 = \frac{k_{21}.N_0}{k_{32}-k_{21}} + A$

donc $A = \frac{k_{21}.N_0}{k_{21}-k_{32}}$

(8) devient alors :

$$Q_{2(T)} = \frac{k_{21}.N_0}{k_{32}-k_{21}}.e^{-k_{21}.T} + \frac{k_{21}.N_0}{k_{21}-k_{32}}.e^{-k_{32}.T}$$

soit $Q_{2(T)} = \frac{k_{21}.N_0}{k_{32}-k_{21}}.\left[e^{-k_{21}.T} - e^{-k_{32}.T}\right]$

La fonction de ponte (3), $y = \frac{dQ_3}{dt} = k_{32}.Q_2$ devient :

$$y = \frac{k_{32}.k_{21}}{k_{21}-k_{32}}.N_0.\left[e^{-k_{21}.(t-T_0)} - e^{-k_{32}.(t-T_0)}\right] \qquad (9)$$

Des ajustements réalisés avec cette fonction ont montré la très forte liaison entre k_{21} et k_{32}, et ont attribué des valeurs égales aux deux paramètres. Compte tenu de cette redondance, le modèle a été simplifié comme suit :

- écrivons (9) sous la forme :

$$y = k_{32}.k_{21}.N_0.\left[\frac{e^{-k_{21}.(t-T_0)} - e^{-k_{32}.(t-T_0)}}{k_{21}-k_{32}}\right]$$

- on peut démontrer que si k_{21} et k_{32} tendent vers la même valeur k alors le modèle (9) tend vers la forme :

$$y = k^2.N_0.(t-T_0).e^{-k.(t-T_0)} \qquad (10)$$

Si on pose : $P_1 = N_0$: nombre total de larves pondues par les pucerons

$P_2 = T_0$: jour moyen calculé où les pucerons commencent à pondre

$P_3 = k$

(10) devient :

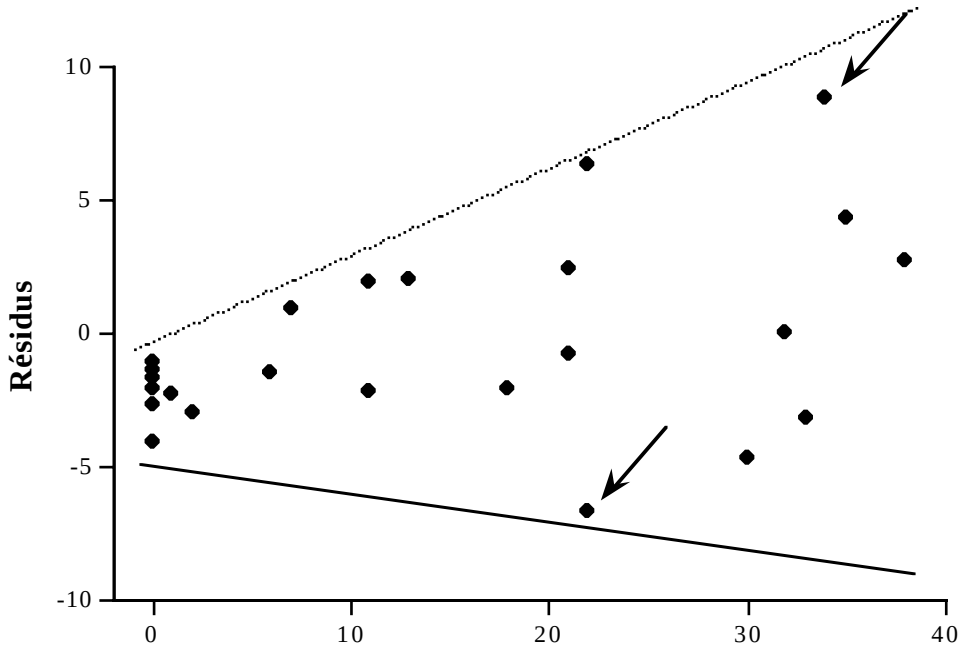
$$\boxed{y = P_3^2.P_1.(t-P_2).e^{-P_3.(t-P_2)}}$$

Fiche N° 14B

Justification du choix du modèle utilisé pour décrire la dynamique de ponte des pucerons

De nombreux modèles peuvent être appliqués pour paramétrer la dynamique de fécondité des pucerons ; quelques uns sont décrits dans la littérature (Bieri *et al.*, 1983 ; Graf *et al.*, 1990 ; Simon *et al.*, 1991 ; Schmitz *et al.*, 1993 ; Ruggle et Holst, 1994). Mais ces modèles ont généralement le grave inconvénient d'être empiriques, leurs paramètres constitutifs n'ayant aucune signification biologique. La démarche de certains auteurs consiste ainsi à appliquer un modèle et à rechercher *a posteriori* une signification biologique plus ou moins exacte de tout ou partie des paramètres. Divers critères nous ont guidé dans le choix entre différents modèles testables et/ou testés. Compte tenu des remarques précédentes, notre choix s'est avant tout orienté vers une fonction dont les paramètres ont une valeur descriptive de la dynamique de fécondité des pucerons. Il a aussi été tenu compte de la simplicité de la loi d'ajustement. Outre les estimées des paramètres, certains critères nous permettent de juger de la pertinence de l'ajustement et de sa précision : l'écart-type lié à la détermination de chaque paramètre, l'intervalle de confiance (approximatif) des estimées de la fonction, les corrélations entre paramètres et surtout le critère d'optimalité (somme des carrés des écarts résiduels). La prise en compte de ces caractéristiques repose sur l'hypothèse que le modèle retenu est exact, et que la variance de la fonction d'ajustement est constante dans tout le domaine exploré. Or précisément, dans tous les ajustement effectués, l'examen des résidus montre que :

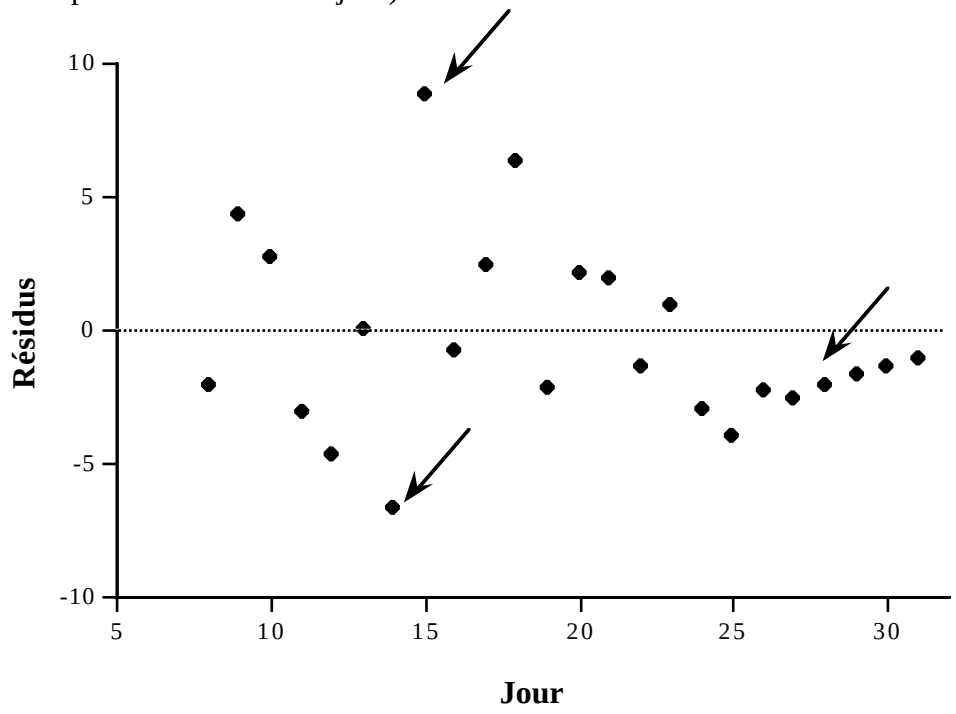
-1) la variance de la fonction d'ajustement n'est pas constante dans tout le domaine : pour des *y* grands les résidus sont importants et inversement[5] :



[5] Graphes des résidus calculés pour l'ajustement des données observées correspondant au nombre de larves pondues par jour par des pucerons de l'espèce *Myzus persicae* sur des milieux standards Ap2. Les flèches désignent les résidus les plus importants ou ne se distribuant pas aléatoirement.

Ceci peut s'expliquer facilement par le fait que les pucerons ne pondent pas en continu (variabilité intra-individuelle), ni de manière synchrone (variabilité inter-individuelle). Il aurait fallu augmenter soit le pas des observations (relevé toutes les 6 ou 12 h), soit le nombre des individus pour minimiser ces facteurs et obtenir un meilleur lissage de la courbe de fécondité des données observées.

2) - le modèle néglige certains points (résidus très importants), ce qui est sans aucun doute la conséquence de la remarque précédente. Enfin, les résidus ne sont pas aléatoires, en effet, l'ajustement passe en dessus des derniers points expérimentaux (relevés après le 24 ou 25ème jour) :



Le modèle est donc pas encore optimalement adapté aux données. Il traduit mal le fait que les pucerons s'arrêtent de pondre quelques jours (variables selon les modalités) avant de mourir. Nous aurions vraisemblablement pu obtenir un meilleur ajustement soit :

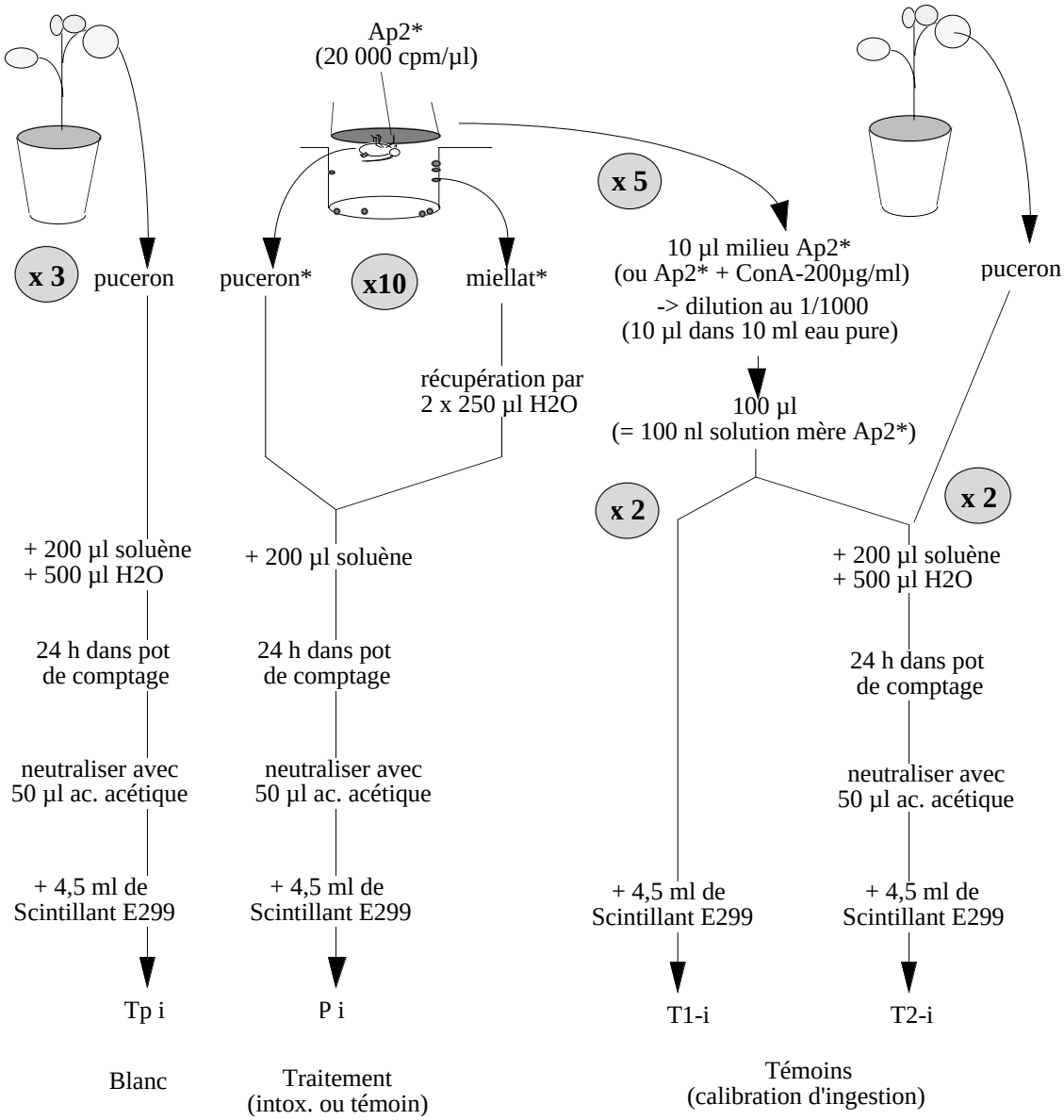
- en appliquant le même modèle mais sur un intervalle de temps correspondant à la durée moyenne de ponte des pucerons (période reproductive) calculée pour chaque modalité,

- en effectuant une nouvelle analyse, sur le même intervalle de temps, en utilisant une pondération des points observés.

Mais finalement nous avons gardé le premier modèle : la première solution néglige la période post-reproductive qui est un paramètre important pour décrire les effets toxiques et il n'est pas certain que la deuxième solution nous aurait fourni plus d'informations que nous en apportait le premier ajustement.

Fiche N° 15

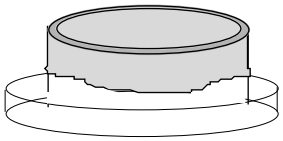
Mesure de l'ingestion à l'aide de milieu marqué
(inuline ^{14}C = *)



Fiche N° 16

Récolte du miellat excrété par des pucerons sur milieu artificiel

20 pucerons âgés de 7 j **x 5**



cupule stérile

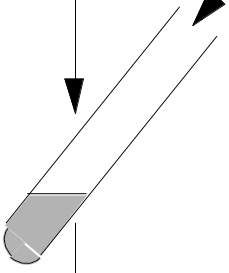
+ 72 h

enlever exuvies et pucerons morts

sécher les cupules

reprendre le miellat par 2 rinçages avec 2,5 ml H2O pure

ajouter 5 volumes éthanol 95°



précipitation
1 nuit , +4°C

centrifugation
20 000 g , 15 min, +4°C

culot séché au SpeedVac

surnageant

reprendre par 2 rinçages avec 300 µl H2O pure et transvaser dans un eppendorf

sécher et reprendre dans le tampon d'introduction

ELECTROPHORESE

Fiche N° 17

Protocole d'électrophorèse sur plaque de gel

1. Préparations des gels

gel de séparation (running) - pH 8,8 ; Tris 1,5 M ; 15 % acrylamide

- mélanger :

eau distillée	2,35 ml
tampon sep	2,5 ml
SDS 10 %	100 µl
acrylamide	5 ml

- dégazer à température ambiante pendant plus de 15 min
- juste avant de couler les gels ajouter :

TEMED	5 µl
persulfate	50 µl

volume de solution finale : 10 ml

- agiter et remplir les plaques

gel d'espacement (stacking) - pH 6,8 ; Tris 0,125 M ; 4 % acrylamide

- mélanger :

eau distillée	6,1 ml
tampon esp	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
acrylamide	1,3 ml

- dégazer à température ambiante pendant plus de quinze minutes
- juste avant de couler les gels ajouter :

TEMED	10 µl (0,1 %)
persulfate	50 µl (0,05 %)

volume de la solution finale : 10 ml

- agiter et remplir les plaques

2. Kit de calibration de PM (Pharmacia, LKB)

Phosphorylase b	94 kDa
Bovine Sérum Albumine	67 kDa
Ovalbumine	43 kDa
Carbonic Anhydrase	30 kDa
Soybean Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
α Lactalbumin	14,4 kDa

3. Solutions utilisées

acrylamide solution d'acrylamide à 30% et de bisacrylamide à 0,8% (ou bisacryloycystamine à 1,35 %)

SDS 10% solution de Lauryl sulfate à 10% dans l'eau

tampon séparation

Tris base	18,2 g
SDS 10%,	4 ml
	qsq 100 ml eau,

pH ajusté par HCl (pH 8,8 ; Tris 1,5 M ; SDS 0,4%)

tampon espacement

Tris base	6,06 g
SDS 10%,	4 ml
	qsq 100 ml eau,

pH ajusté par HCl (pH 6,8 ; Tris 0,5 M ; SDS 0,4%)

persulfate solution extemporanée de persulfate d'ammonium à 10% dans l'eau

TEMED TEMED pour électrophorèse

tampon de migration

Tris base	3 g
glycine	14,4 g
SDS 10%,	10 ml
	qsq 1l eau,

(Tris 0,025 M ; 0,192 M glycine ; SDS 0,1 %)

solution de dépôt des échantillons

Dithiotréitol (DTT)	0,3 g
SDS (10 %)	4 ml
Tampon (Tris HCl 1,5 M ; pH 6,8)	1,6 ml
Glycérol 87 %	2,5 g
Bleu de bromophénol	1,5 mg
	qsq 20 ml d'eau

bleu de Coomassie (coloration des gels)

R-brillant blue (Sigma)	1 g
acide acétique (10 % v/v)	100 ml
méthanol (40 % v/v)	400 ml
eau distillée	500 ml

les gels sont colorés de trente minutes à une nuit à 37°C sous agitation

solution de décoloration I (fixation)

acide acétique (10 % v/v)	100 ml
méthanol (40 % v/v)	400 ml
eau distillée	500 ml

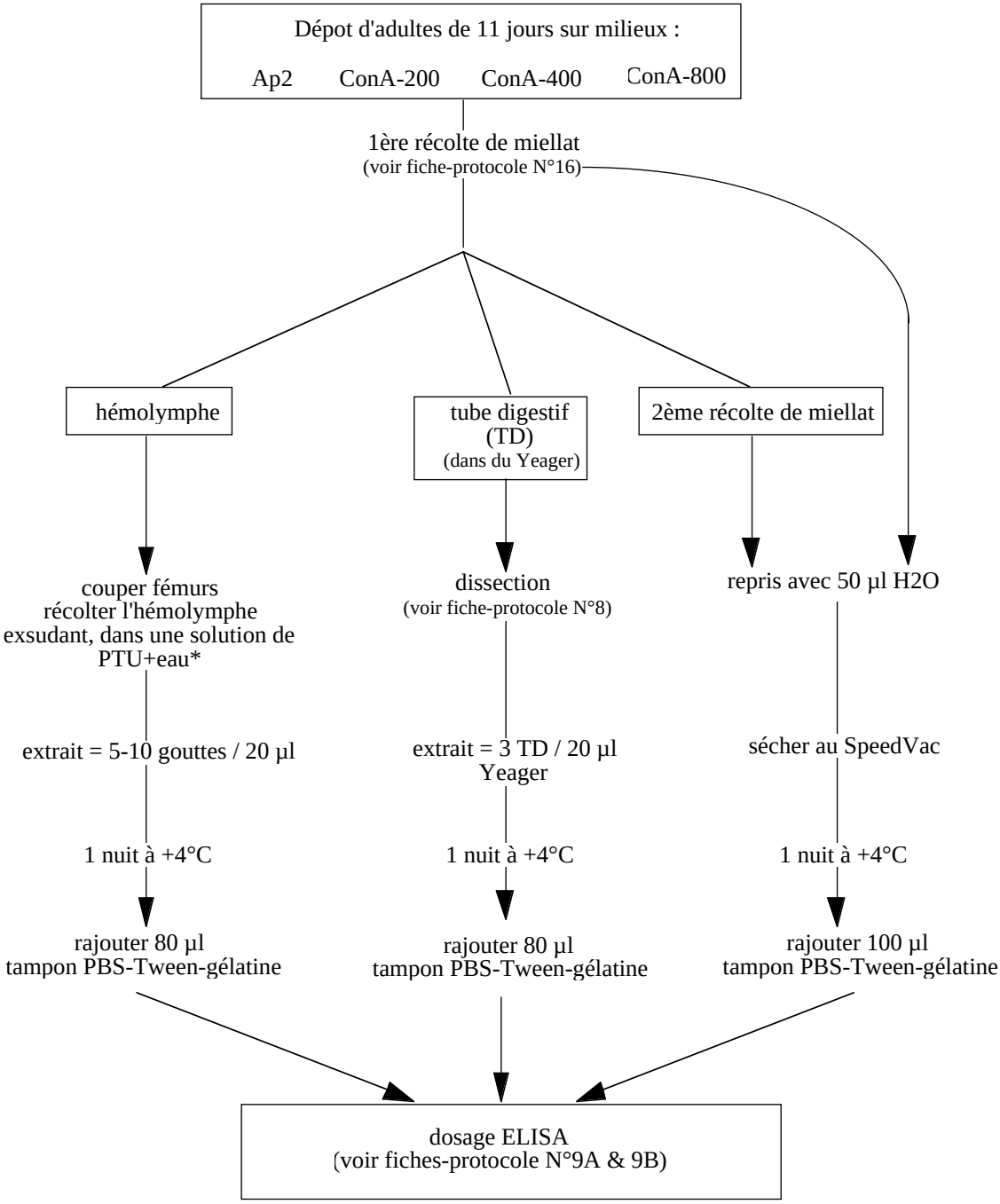
les gels sont décolorés dans deux ou trois bains) 37°C (sous agitation)

solution de décoloration II (conservation)

acide acétique (10 % v/v)	100 ml
méthanol (5 % v/v)	50 ml
eau distillée	850 ml

Fiche N° 18

Préparation des échantillons de miellat, de tube digestif et d'hémolymphe avant dosage de la ConA par ELISA



* solution saturée en PTU (Phénylthio-urée : inhibiteur de la mélanisation)

Fiche N° 19

Solution physiologique insecte : formule de Yeager adaptée aux charançons (Nardon, 1978)

NaCl	10 g
KCl	1,5g
$CaCl_2$	0,5 g
$NaHCO_3$	0,18 g
$NaH_2\ PO_4$	0,01 g
Glucose	1 g
Lévulose	0,4 g
Maltose	15 g
	qsq à 1000 ml d'eau,
	p.o. = 400 mosM, pH = 6,8.

Fiche N° 20

Préparation des coupes histologiques

Matériel

1. Fixation du matériel dans le liquide de Duboscq Brasil (24 h à 8 j)

Composition : 160 ml d'alcool à 80 %
60 ml de formol
15 ml d'acide acétique
1 g d'acide picrique

2. Doubles inclusions gélose-paraffine

- Préparation de la gélose : 1,3 g de gélose dans 100 ml d'eau distillée
  - laisser gonfler 1/2 heure
  - dissoudre à chaud
  - filtrer

  (conservation à 4°C)

- Première inclusion (dans la gélose)
  - hydrater les pièces (pucerons) par simple rinçage à l'eau
  - dissoudre la gélose en plaçant le tube au bain-marie bouillant
  - avec un compte-goutte, faire un coussinet de gélose sur une lame propre
  - laisser prendre la gélose
  - placer les pièces à la surface
  - éliminer le plus d'eau possible
  - recouvrir d'une couche de gélose
  - laisser prendre
  - mettre trente minutes dans de l'alcool à 70 % afin de durcir la gélose
  - découper la gélose en petits blocs contenant les pièces et les déshydrater :
  - 2 x 10 min dans de l'alcool à 95 %
  - 2 x 15 min dans de l'alcool à 100 %
  - alcool butylique (autant de temps que les pièces sont restées dans le fixateur)

- Seconde inclusion (dans la paraffine)
  - afin d'éliminer progressivement l'alcool butylique, passer les pièces dans trois bains de paraffine
  - l'inclusion se fait entre deux barres de Lenckart

Obtention des coupes

Le bloc de paraffine obtenu est taillé de façon à ce qu'il reste le minimum de paraffine autour des pièces. Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome Historange LKB. L'épaisseur choisie est de 6 µm. Le ruban obtenu est découpé et déposé sur une lame préalablement enduite d'albumine glycérinée. Une goutte d'eau distillée est déposée afin que les morceaux de paraffine adhèrent à la lame.
La lame est déposée sur une platine chauffante, la paraffine s'étend. Le surplus d'eau est éliminé et la lame est mise à sécher une nuit dans une étuve à 37°C.

Coloration

1. Déparaffinage : passage durant quelques secondes dans :

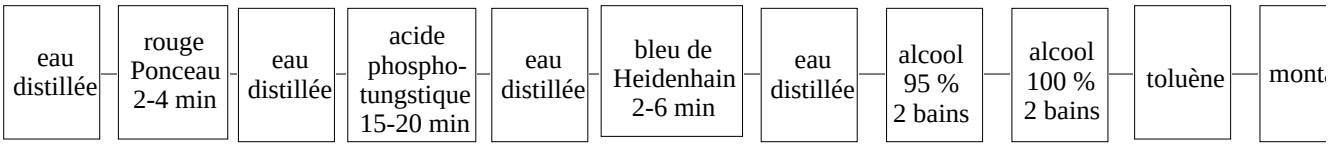
Toluène
2 x Alcool 100 %
2 x Alcool 95 %
eau

2. bleu Toluidine à 1 ‰, pH 4,8 (quand le pH est acide, on augmente la sélectivité de la coloration au BT) :

ADN, ARN et certaines protéines deviennent bleues.

3. Rouge Ponceau - Bleu de Heidenhain

ROUGE PONCEAU PHOSPHOTUNGSTIQUE		BLEU de HEIDENHAIN		ACIDE	
Rouge Ponceau 5	1 g	Bleu aniline	0,5 g	Acide phosphotungstique	2,5 g
Acide acétique	1 ml	Orange G	2 g	Eau distillée	50 ml
Eau distillée	100 ml	Acide acétique	8 ml		
		Eau distillée	100 ml		



Fiche N° 21

Préparation de tampons phosphate (Sorensen) à x M[6] (zone tampon : 5,0 à 8,2)

Solution de Phosphate monosodique x M :

$NaH_2PO4, 2H_2O$ (PM = 156)	x .156
Eau distillée	qsq 1000 ml

Solution de Phosphate disodique x M :

$Na_2HPO_4, 12H_2O$ (P.M. = 358)	x .358 g
Eau distillée	qsq 1000 ml

Mélange tampon :

pH	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8
Phosphate monosodique	51 ml	39 ml	28 ml	19 ml	13 ml	8,5 ml
Phosphate disodique	49 ml	61 ml	72 ml	81 ml	87 ml	91,5 ml

N.B. : Le phosphate disodique 0,2 M cristallise facilement lors du stockage à froid. On peut également préparer un tampon monopotassique, dipotassique.

Solution de phosphate monopotassique :

KH_2PO_4 (PM = 136)	x .136 g
Eau distillée	qsq 1000 ml

Solution de phosphate dipotassique :

K_2HPO_4 (PM = 174)	x .174 g
Eau distillée	qsq 1000 ml

ou monosodique/ dipotassique. Les proportions des dilutions pour l'obtention du pH sont sensiblement identiques pour ces différents phosphates sodiques ou potassiques.

[6] x représente la concentration molaire du tampon (0,2 M- 0,4 M, etc) que l'on souhaite réaliser.

Fiche N° 22A

Fixateurs utilisés pour la fixation des larves de pucerons en vue d'observations en microscopie électronique à transmission

---

Glutaraldéhyde

Formule : $COH\ (CH_2)_3COH$ PM = 100

Le glutaraldéhyde est commercialisé en ampoules scellées ou en flacons de différentes concentrations.

Glutaraldéhyde à 4 % :

Glutaraldéhyde à 50 %	8 ml
Eau distillée	92 ml

Glutaraldéhyde à 6 % :

Glutaraldéhyde à 50 %	12 ml
Eau distillée	88 ml

Les solutions de glutaraldéhyde se conservent au réfrigérateur.

Paraformaldéhyde

Formule : $(CH_2O)n$ PM = (30)n

Le paraformaldéhyde (trioxyméthylène) est un polymère du formol. Il se dissout dans l'eau légèrement alcaline, à chaud si la solution est concentrée.

Paraformaldéhyde à 20 %

Dans un erlenmeyer de 25 ml mettre 10 ml d'eau distillée tiède. Ajouter 2 g de paraformaldéhyde en poudre. Laisser hydrater pendant 2 à 3 min et agiter 5 min dans la cuve à ultra-sons. Boucher le récipient avec un morceau de papier d'aluminium et placer dans une étuve à 80-90°C pendant 30 min à 1 h. Ajouter, ensuite, une ou deux gouttes de soude N pour éclaircir la solution. Refroidir. On obtient ainsi une solution stock de paraformaldéhyde à 20 %, d'osmoralité 3.800 m0sM environ (conservation, un mois au réfrigérateur).

Tetroxyde d'osmium

Formule : OsO_4 PM = 254

Improprement appelé "acide osmique" il est commercialisé pur, cristallisé, en ampoule de 0,25 g ; 0,5 g ; 1 g ; 5g.

Tétroxyde d'osmium à 4 % :

Bien laver deux ampoules d'OsO_4 de 0,5 g. Dans un flacon fermant hermétiquement et très propre, verser 25 ml d'eau distillée. Sous la hotte : poser l'ampoule sur un papier filtre et la strier transversalement à l'aide d'une pointe de diamant ; chauffer au rouge une baguette de verre et l'appliquer rapidement sur la strie, l'ampoule doit de briser, sinon répéter l'opération. Transférer tous les morceaux des deux ampoules et les cristeaux d'OsO_4 dans le flacon. Laisser dissoudre une nuit à température ambiante.

La solution se conserve dans une double enceinte bien fermée.

Fiche N° 22B

Fixation et déshydratation des larves de pucerons en vue d'observations en microscopie électronique à transmission

	Solution de départ (peut se conserver)	Mélange final (à préparer extemporanément)
Fixation aldéhydique		
1 volume de glutaraldéhyde à 4 %	1 %	100 mOsM
1 volume de paraformaldéhyde à 2 %	0,5 %	100 mOsM
2 volumes de tampon phosphate à 0,2 M ... (mono Na/diK, pH = 7,4)	0,1 M	200 mOsM
Osmolarité totale		400 mOsM

Temps de fixation : 24 h à 3 j à température ambiante dans des piluliers en verre de 10 ml.

Lavage

Il est réalisé avec le tampon seul, en légère hyperosmolarité.

Tampon phosphate mono Na/di K .....0,175M .....350 mOsM. (pH = 7,4)

Temps de lavage : 5 bains de 1 h à +4°C, 1 bain d'une nuit.

Post fixation

1 volume Os04 à 4 %	2 %	80 mOsM
1 volume de tampon phosphate 0,2 M ... (mono Na/di K, pH = 7,4)	0,1M	200 mOsM
Osmolarité totale		280 mOsM

Temps de fixation : 2 h à température ambiante.

Déshydratation éthylique standard

Elle se pratique à température ambiante. Au sortir des liquides de lavage, les pièces séjournent dans les bains suivants :

Alcool éthylique 30 %	un bain 10 min
Alcool éthylique 50 %	un bain 10 min
Alcool éthylique 70 %	un bain 10 min
Alcool éthylique 95 %	un bain 10 min
Alcool absolu	2 à 3 bains de 10 min

Fiche N° 22C

Inclusion dans la "London Resin White" (Newman *et al.*, 1982)

Produits

La “London Resine White” est une résine acrylique hydrophile permettant des réactions sur coupes ultrafines (immunocytochimie, cytochimie), commercialisée sous forme :

-1) d'un mélange du monomère (méthacrylate) et d'un durcisseur qui peut se conserver une année à 4°C. Trois types de mélange sont proposés :

- London resin hard
- London resin medium (mélange utilisé)
- London resin soft

-2) d'un accélérateur

rem : faible toxicité de ces produits.

Technique

Pour la microscopie photonique, il est préférable d'effectuer une fixation aldéhydique seule. Pour la microscopie électronique, on peut pratiquer une double fixation (mais il ne faudra pas utiliser d'accélérateur).

Pour une étude conjointe, on peut effectuer après la fixation aldéhydique classique, un contraste avec de l'acide phosphotungstique à 1 % (poids/volume) dans le premier bain d'alcool éthylique absolu, à la fin de la déshydratation. La déshydratation a lieu classiquement dans une série d'alcools éthyliques de degrés croissants. L'acétone et l'époxy 1-2 propane[7] sont à déconseiller. L'infiltration s'effectue dans la solution commerciale, soit à température ambiante, soit éventuellement à 60°C.

- 4 bains de résine à 1 heure d'intervalle
- 1 nuit dans la résine
- inclusion dans des moules hermétiques (gélules ou verre), pour éviter le contact avec l'oxygène qui empêche la polymérisation.
- polymérisation 24 heures à 60°C ± 2°C

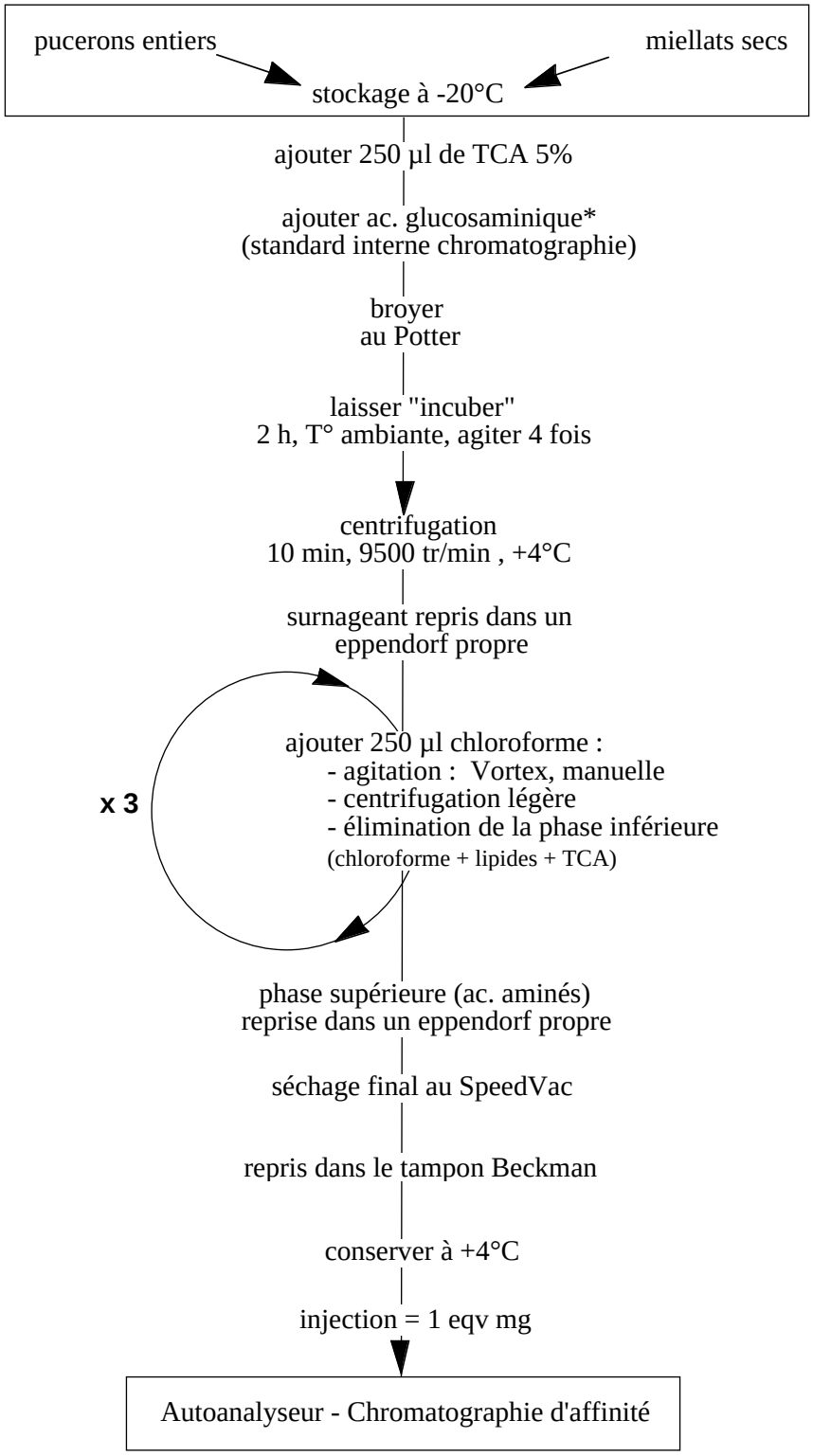
rem : l'utilisation de l'accélérateur (1 goutte pour 10 ml de résine) n'est pas indispensable. Elle permet seulement de démarrer rapidement la polymérisation (attention ! en 10 min, le mélange devient très visqueux).

Les contrastes ultérieurs sont réalisés dans l'acétate d'uranyle aqueux (et non alcoolique).

[7] ou oxyde de propylène

Fiche N° 23

Extraction des acides aminés libres
(broyats de pucerons , extraits de miellat)



* concentration : 2,5 nmol/µl

Annexes

Annexe 1A

Fiche descriptive du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* (Harris)

(d'après Blackman et Eastop, 1985)

Acyrthosiphon pisum (Harris) 'Pea Aphid' Plate 101
(= *destructor, pisi, onobrychidis*)

A. pisum is a complex of races and subspecies with different host plant ranges and preferences, some recognizable by their morphology, but the extent of interbreeding is largely unknown.

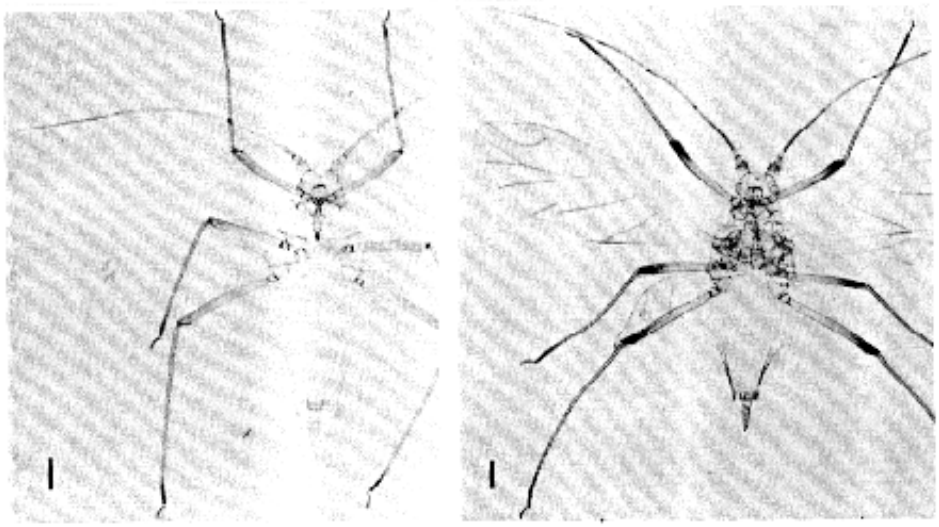
Appearance in life: Rather large, green, or pink aphids with slender appendages forming colonies on young growth and developing pods of many herbaceous and some shrubby Leguminosae. Immatures very lightly dusted with wax. Apterae 2.5–4.4 mm, alatae 2.3–4.3 mm.

Host plants: Mostly Leguminosae of the tribes Genisteae (*Cytisus, Genista, Sarothamnus, Spartium*), Trifolieae (*Medicago, Melilotus, Ononis, Trifolium, Trigonella*), Fabeae (*Lathyrus, Lens, Pisum, Vicia*), Hedysareae (*Hippocrepis, Onobrychis*), and also colonizing a few members of other tribes, e.g. *Lotus* (Loteae), *Astragalus* (Galegeae), and *Glycine* (Phaseoleae). Under dry conditions sometimes found on *Capsella bursapastoris*. There is much evidence that, at least in Europe, many populations occur with particular host-plant preferences; e.g. pea-feeding populations are distinguishable from those colonizing *Medicago* (Müller 1980). One form which lives only on *Ononis* is probably a distinct species.

Virus transmission: A vector of more than 30 virus diseases, including non-persistent viruses of beans, peas, beet, clover, cucurbits, Narcissus, and Cruciferae, and the persistent viruses pea enation mosaic and pea leaf-roll.

Distribution: Originally probably palaearctic, now almost world-wide, although a number of the earlier records of *A. pisum* from outside Europe apply to species such as *Macrosiphum euphorbiae* and *Aulacorthum solani*. C.I.E. Distribution Map **23** (revised 1982).

Biology: Holocyclic on various leguminous hosts in temperate regions; in warmer climates there is presumably facultative anholocycly. Both apterous and alate males are known. Cook (1963) gives an account of the ecology of *A. pisum* in North America. Starý and Gonzalez (1978) discuss the parasite complex of *A. pisum* in central Asia. Mackay *et al.* (1983) studied sexual morph production. Eastop (1971) gives references to a selection of the enormous literature on this species. Probably relatively few genotypes have been distributed outside Europe and hence the biology and host-plant relations of introduced populations may show significant differences (Blackman, 1981). $2n = 8$.



101

Annexe 1B

Fiche descriptive du puceron du melon *Aphis gossypii* Glover

(d'après Blackman et Eastop, 1985)

Aphis gossypii Glover Melon Aphid, Cotton Aphid Plate 31

Appearance in life: Apterae are very variable in colour. Large specimens are dark green, almost black, but the adults produced in crowded colonies at high temperature may be less than 1 mm long and very pale yellow to almost white. Most commonly light green mottled with darker green, with dark siphunculi and a pale or dusky cauda. Often ant-attended. Apterae 0.9–1.8 mm, alatae 1.1–1.8 mm.

Host plants: Extremely polyphagous. Crop plants attacked include cotton, cucurbits, citrus, coffee, cocoa, eggplant, peppers, potato, okra, and many ornamental plants including *Hibiscus*. Regarded as a major pest of cotton and cucurbits on which it builds up large populations.

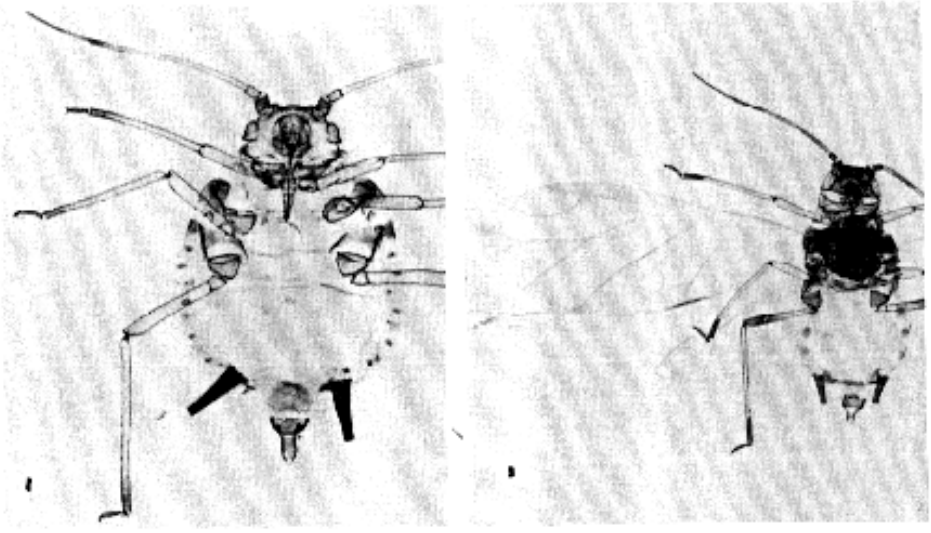
Virus transmission: Known to transmit over 50 plant viruses, including non-persistent viruses of beans and peas, crucifers, celery, cowpea, cucurbits, *Dahlia*, lettuce, onion, pawpaw, peppers, soybean, strawberry, sweet potato, tobacco, and tulips. A vector of the persistent viruses cotton anthocyanosis, lily rosette, lily symptomless, and pea enation mosaic.

Distribution: Virtually world wide, but in colder temperate regions confined to glasshouses (where it is a major pest). Particularly abundant and well distributed in the tropics, including many Pacific islands.

Biology: The taxonomic status of *A. gossypii* is problematic, and hence the interpretation of biological information is difficult. Although anholocyclic in Europe, *A. gossypii* is closely related to European *Aphis* species of the *frangulae* group utilizing *Frangula alnus* as primary host (Thomas, 1968). This indicates a palaearctic origin. However, Kring (1959) demonstrated holocyclic overwintering by *A. gossypii* in Connecticut, U.S.A., with *Catalpa bignonioides* and *Hibiscus syriacus* utilized as primary hosts. Either separate Nearctic and Palaearctic species are confused under the same name or, more probably, *A. gossypii* has re-acquired its holocycle in North America utilizing new primary host plants.

On a world-wide basis, *A. gossypii* comprises an indefinite number of anholocyclic lines, some of which may have particular host-plant associations. For example, *A. gossypii* occurs on chrysanthemums and cucumbers in British glasshouses, but aphids from chrysanthemums will not colonize cucumber, and vice versa—although both can be reared on cotton. The chrysanthemum-living form has acquired resistance to organophosphorus and carbamate insecticides, the cucumber-living form has not; this example shows that in certain respects it may be necessary to consider separate populations of *A. gossypii* as distinct taxonomic entities.

The literature on *A. gossypii* is extensive; see Barbagallo (1966b, pp. 217–23) and Kranz *et al.* (1977, pp. 328–29) for short introductory accounts. $2n = 8$.



Annexe 1C

Fiche descriptive du puceron du pêcher *Myzus persicae* (Sulzer)

(d'après Blackman et Eastop, 1985

Myzus persicae (Sulzer)

Green Peach Aphid, Peach–Potato Aphid . Plate 81

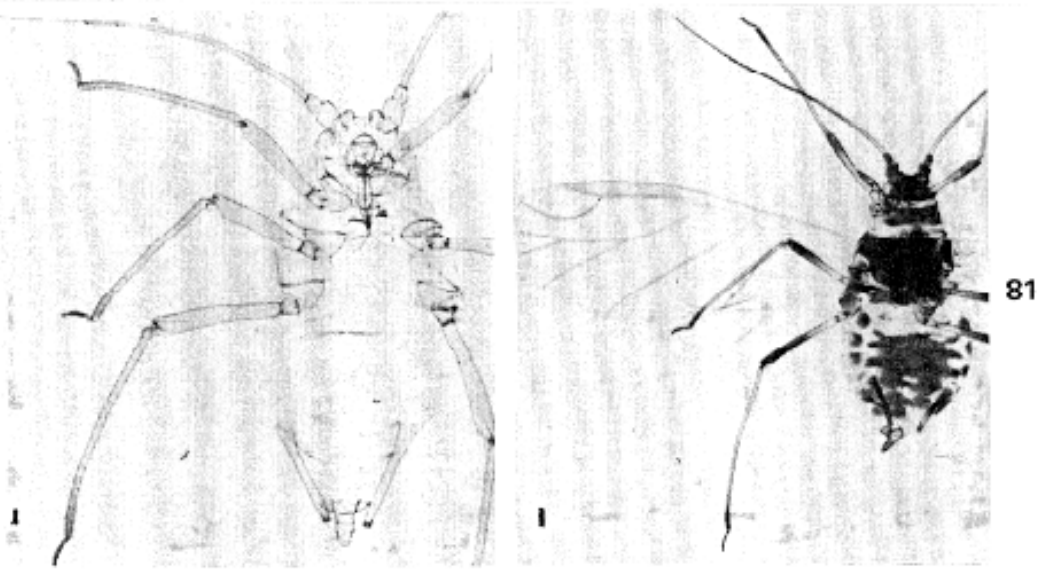
Appearance in life: Adult apterae small to medium-sized, whitish green, pale yellow green, grey green, mid-green, pink, or red, more deeply pigmented green or magenta in cold conditions; rather uniformly coloured, not shiny. Alatae have a black central dorsal patch on the abdomen; immatures of the alate morph, especially in autumn populations, are often pink or red. In colonies curling young leaves of peach in spring, or in more dispersed populations on many other plants, often on older leaves. Apterae and alatae 1.2–2.3 mm.

Host plants: Primary host usually *Prunus persica*, sometimes *P. nigra*, *P. tomella*, and possibly *P. serotina* and peach–almond hybrids. Secondary hosts are in over 40 different plant families, and include very many economically important plants.

Virus transmission: The most important aphid virus vector, shown to be able to transmit well over 100 plant viruses (Kennedy *et al.*, 1962). Persistent viruses transmitted include beet mild yellowing, beet yellow net, beet mild yellows, pea enation mosaic, pea leaf roll, potato leaf roll, radish yellows, tobacco vein distorting, and tobacco yellow vein banding. The relationship with potato leaf roll has received particular attention (e.g. Ponsen, 1972; Eskanderi *et al.*, 1979).

Distribution: Probably of Asian origin, like its principal primary host; now world wide.

Biology: Heteroecious holocyclic between *Prunus* and secondary host plants, but anholocyclic on secondary hosts in many parts of the world where peach is absent, and where the climate permits active stages to survive the winter season. The literature on *M. persicae* is immense, but there have been extensive reviews of ecology (van Emden *et al.*, 1969; Mackauer and Way, 1976), as well as discussions of migration and spatial dynamics (Taylor, 1977), biological approaches to control (Blackman, 1976), and development of resistance to insecticides (Georghiou, in press). This aphid has also been the subject of much laboratory research; for example, studies of the anatomy and function of the gut (Forbes, 1964), nutritional studies using host plants (van Emden, 1977) and artificial diets (Mittler, 1976), photoperiodic responses (Takada, 1982), and genetic variation of enzyme systems (May and Holbrook, 1978; Takada, 1979). $2n = 12$; a form heterozygous for a chromosomal translocation is world-wide and common (Blackman *et al.*, 1978), and anholocyclic clones (often darker green in colour) frequently have one or two chromosomes dissociated.



81

Annexe 1D

Fiche descriptive du puceron de la pomme de terre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas)

(d'après Blackman et Eastop, 1985)

Macrosiphum euphorbiae (Thomas) Potato Aphid Plate 109
(= *solanifoli* Ashmead)

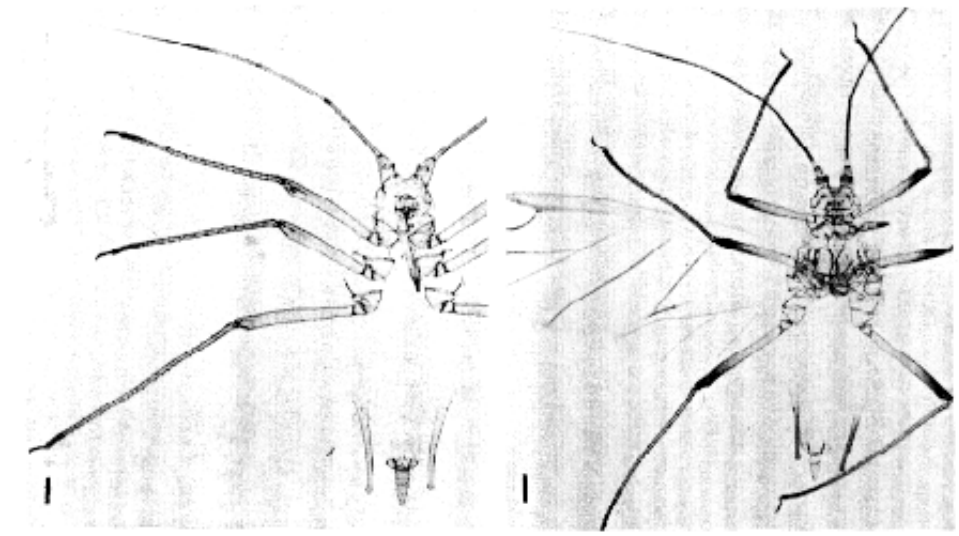
Appearance in life: Adult apterae medium-sized to rather large, spindle-shaped or pear-shaped, usually some shade of green but sometimes yellowish, pink, or magenta, often rather shiny. Eyes are distinctly reddish. Legs, siphunculi, and cauda mainly same colour as body, but siphunculi often darker towards apices; antennae usually only dark apically, but sometimes almost entirely dark. Immatures rather long bodied, paler than adults with a dark spinal stripe and a light dusting of whitish-grey wax. Alatae have pale greenish to yellow-brown thoracic lobes, and usually only the antennae and siphunculi noticeably darker than in the aptera. Apterae 1.7–3.6 mm, alatae 1.7–3.4 mm.

Host plants: Primary host *Rosa* spp.; highly polyphagous on secondary hosts, feeding on over 200 plant species in more than 20 different families. Solanaceae, especially *Solanum tuberosum*, are particularly favoured secondary hosts.

Virus transmission: A vector of over 40 non-persistent viruses and 5 persistent viruses including beet yellow net, pea enation mosaic, pea leaf roll, and potato leaf roll. However, it appears to be unimportant as a vector of potato leaf roll under field conditions in comparison with *Myzus persicae* (Robert, 1971).

Distribution: Apparently of North American origin, now almost world wide, although it has only recently spread through Central Asia and the Middle East, and has not yet been recorded from the Indian subcontinent (except Ceylon).

Biology: Heteroecious holocyclic in north-eastern U.S.A. with wild or cultivated *Rosa* spp. as primary host plants. Shands *et al.* (1972) studied the ecology of populations on *Rosa palustris* in Maine. In Europe and probably elsewhere *M. euphorbiae* is mainly anholocyclic, although sexual morphs are sometimes produced in small numbers and the holocycle may sometimes occur (Möller, 1971b). The literature on *M. euphorbiae* is very large. Meier (1961) provides a general account of the aphid in Europe. Barlow (1962) studied its development on potato, MacGillivray and Anderson (1964) studied the factors controlling sexual morph production. Parasites and hyperparasites were



109

Annexe 1E

Fiche descriptive du puceron commun des serres *Aulacorthum solani* (Kaltenbach)

(d'après Blackman et Eastop, 1985)

Aulacorthum Mordvilko — Aphidinae: Macrosiphini

Nearly 50 species of *Aulacorthum* are known of which 32 are from the eastern palaearctic and oriental region. The subgenus *Neomyzus* only occurs in this area except for the widely distributed glasshouse pest *A. (N.) circumflexum*. Most of the remaining species are western palaearctic; the few described from North America seem to belong to other genera, e.g. *Placoaphis*. The genus is defined by the parallel-sided inner faces of the spinulose antennal tubercles.

A. solani is one of the most polyphagous aphids and *A. magnoliae* in the East is also recorded from members of many different plant families. There is a similar lack of pattern in the hosts of the plant-specific species. Eight species of *Aulacorthum* are described from Compositae, 4 from Liliaceae, 3 each from Ericaceae and Labiatae, and 2 from Dipsacaceae, Lauraceae, Oleaceae, Rosaceae, and Rutaceae. Accounts are available from Europe (Hille Ris Lambers, 1947b, 1949), Japan (Miyazaki, 1971, in *Acyrthosiphon*), India (Raychaudhuri, 1980), Java (van der Goot, 1917/18), and Canada (Richards, 1972b).

Aulacorthum solani (Kaltenbach)
Glasshouse–Potato Aphid, Foxglove Aphid Plate 98

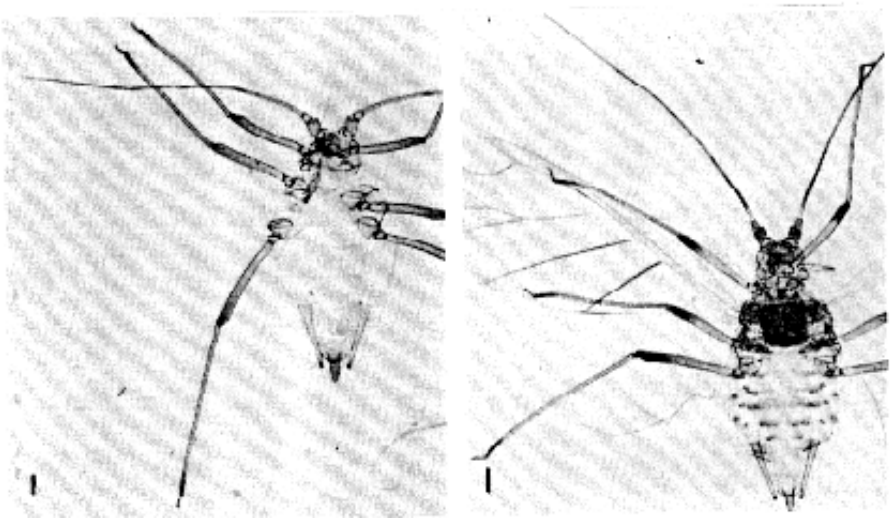
Appearance in life: Colour of apterae variable, from a rather shiny, whitish green or yellow, in which case there is usually a conspicuous bright green or rust-coloured spot at the base of each siphunculus, to a uniformly dull green or greenish brown. Appendages mainly pale except for dark brown apices to the tibiae, siphunculi, and antennal segments. Alatae look quite different, with dark brown head and thorax, much darker antennae, legs, and siphunculi, and a variably developed pattern of transverse dark bars on the dorsal abdomen. Apterae and alatae 1.8–3.0 mm.

Host plants: Extremely polyphagous, colonizing plants in many different families of both dicots and monocots (but not Gramineae). Bulbs (especially tulips) often have large populations of *A. solani*, and it is a common pest in glasshouses and on pot plants. Common on potatoes.

Virus transmission: A vector of about 40 plant viruses including both persistent and non-persistent viruses of beet and potato. Müller *et al.* (1973) studied intra-specific variation in the ability to transmit pea enation mosaic virus.

Distribution: Probably of European origin, but now almost world-wide.

Biology: The biology of *A. solani* is complicated, like that of many of the most important aphid pest species, by the occurrence of numerous races or subspecies, including some with particular host-plant associations (Müller, 1970, 1976). Polyphagous forms of *A. solani* with both holocycly and holocycly occur. Holocyclic *A solani* have either apterous or (more rarely) alate males, and the unusual ability to overwinter as eggs on many different host plant



98

Annexe 1F

Fiche descriptive du puceron du lupin *Macrosiphum albifrons* Essig

(d'après Blackman et Eastop, 1985)

Macrosiphum Oestlund — Aphidinae: Macrosiphini

A genus of about 120 species with elongate legs and antennae, with long siphunculi having polygonal reticulation over the distal 5–30% (mostly 8–18% in apterae and 15–25% in alatae), with hairs of medium length, and with little dorsal abdominal pigmentation. Several of the well-known species (*rosae, euphorbiae, pallidum*) alternate from *Rosa* to herbaceous secondary hosts but most species are monoecious on a wide variety of herbs and shrubs. As far as known most species have alate males. About half the species are described from North America, although some of these have seldom or never been recognized again and may really be synonyms of better known species. About 36 species are known from Europe and the remainder are from Central Asia, India, and the Far East. Three South American species may also belong in *Macrosiphum*. *Sitobion*, often treated as a subgenus of *Macrosiphum*, is here treated as a separate genus. Accounts of *Macrosiphum* are available for Europe (Hille Ris Lambers, 1939), Germany (Müller, 1969), Switzerland (Meier, 1961), Central Asia (Nevsky, 1929; Narzikulov and Umarov, 1969), Japan (Miyazaki, 1971), Korea (Paik, 1965), China (Tao, 1963), and India (David, 1976). North American *Macrosiphum* are reviewed by Palmer (1952—Rocky Mountain region), Hottes and Frison (1931—Illinois), Patch (1919—eastern U.S.A.), and Soliman (1927—California). MacGillivray (1968) gives more recent information on some North American species.

Macrosiphum albifrons Essig — Lupin Aphid

Large (3.2–4.5 mm), pale bluish-grey-green aphids, dusted with white wax, on stems and leaves of *Lupinus* spp. Adult apterae have pale brownish siphunculi, whereas the siphunculi of immatures are uniformly dark. Widespread in North America except in south-eastern U.S.A., and introduced into England (Stroyan, 1981). Monoecious holocyclic, with alate males, in North America, but the population in England seems to be anholocyclic. Frazer and Gill (1981) have studied developmental parameters of *M. albifrons* in Canada. $2n = 10$.

Annexe 2

TABLE 11.1.1.1

Examples of insecticide-resistant aphid species for which published bioassay data are available

Species	Insecticide class[a]	References[b]
Aphis fabae Scopoli	OP	Hlinakova and Hurkova (1976)
Aphis gossypii Glover	OP	Kung et al. (1964)
	carb	Furk et al. (1980), Silver (1984)
	pyr	Zil'bermints and Zhuravleva (1984)
Brevicoryne brassicae (Linnaeus)	OP	Ripper (1961)
Chaetosiphon fragaefolii (Cockerell)	OC	Shanks (1967)
Chromaphis juglandicola (Kaltenbach)	OP	Michelbacher et al. (1954)
Hyalopterus pruni (Geoffroy)	OP	Hurkova (1973a)
Myzocallis coryli (Goeze)	carb	Aliniazee (1983)
Myzus persicae (Sulzer)	OP and carb	many (e.g. Hurkova (1973b), Sawicki and Rice (1978), Baker (1978b), Attia et al. (1979))
	pyr	Sawicki and Rice (1978), Attia and Hamilton (1978), Otto (1980)
	OC	Bauernfeind and Chapman (1985)
Phorodon humuli (Schrank)	OP	many (e.g. Hrdy and Zeleny (1968), Muir (1979))
	carb	Muir (1979), Lewis and Madge (1984)
Schizaphis graminum (Rondani)	OP	Teetes et al. (1974), Chang et al. (1980)
Therioaphis trifolii (Monell)	OP	Stern (1962), Walters and Forrester (1979)
	carb	Walters and Forrester (1979)

[a]OP, organophosphorus; OC, organochlorine; carb, carbamate; pyr, pyrethroid.
[b]For a comprehensive list of references, see Georghiou (1981).

(d'après Devonshire, 1989)

Annexe 3A

Mode d'action de la lectine du haricot, PHA et de la Concanavaline A sur des animaux de laboratoire (rats principalement)
(tableau non exhaustif)

Lectine	Modèle d'étude	Mode d'action	Références (* cités par Leon, 1989)
PHA	rat	- altérations de la digestion des protéines et/ou de l'absorption des acides aminés, des lipides et de la vitamine F.	Kakade et Evans, 1966* Hinis et Hague, 1964* Banwell *et al.*, 1983
PHA	rat	- hypoglycémie associée à une diminution de l'utilisation du glucose (mauvaise absorption intestinale)	Hinis *et al.*, 1957*
	rat	- diminution de l'activité des dipeptidases et entérokinases du tube digestif	Pusztai, 1985
	rat	- atrophie des villosités de l'intestin grêle, rupture de la bordure en brosse des entérocytes	Lorenzsoun et Olsen, 1982
		- interférences avec les mécanismes de défense du milieu intérieur en présence de bactéries dans le sang	Jayne-Williams, 1972
PHA	lapin	- diminution de la perméabilité membranaire aux électrolytes	Dobbins *et al.*, 1986
		- réactions allergiques alimentaires suscitées par des lectines du fait de la libération d'histamine par les mastocytes du TD	Hovik *et al.*, 1974*
PHA	rat	- mauvaise efficacité de l'utilisation des sources azotées de l'aliment ; augmentation du catabolisme tissulaire	Pusztai *et al.*, 1981
		- pertes azotées urinaires et fécales augmentant essentiellement à cause d'une variation de la quantité d'urée éliminée. Pertes en partie d'origine endogène : cellules de la muqueuse, sécrétions digestives et albumines plasmatiques éliminées au niveau intestinal	Pusztai, 1991
		- modification de la macro et micro-morphologie de l'intestin grêle : augmentation des sécrétions de la muqueuse hyperplasie des entérocytes	Pusztai, 1991
PHA et autres	rat	- bordure en brosse des entérocytes du duodénum présentant des ponts de rupture après tubage direct dans l'estomac rein : lésions réversibles au début !	Pusztai *et al.*, 1979
PHA	porc, rat	- modifications profondes de la structure des villosités des parties proximales de l'intestin grêle	King *et al.*, 1983
		- pénétration d'une quantité non négligeable de lectine dans les cellules de l'épithélium pour se retrouver au niveau de l'endosome et du lysosome	Lorenzon et Olsen, 1982 Pusztai, 1991
PHA	porc	- lésions dégénératives dans les cellules du pancréas ; lésions associées à une diminution de l'activité des enzymes pancréatiques	King *et al.*, 1983
		- inhibition de l'entérokinase de la bordure en brosse des entérocytes	
		- limitation des enzymes protéolytiques du pancréas dans l'intestin (entérokinase et activatrice des enzymes protéo du pancréas)	
PHA	rat	- passage à travers l'épithélium intestinal et localisation dans le lysosome et les vacuoles de la région du corps de Golgi des entérocytes	Lorenzsoun et Olsen, 1982 Pusztai *et al.*, 1985
PHA	rat, souris	- perturbation du transport intestinal des acides aminés en inhibant les dipeptidases de la bordure en brosse des entérocytes	Pusztai *et al.*, 1981 Hova *et al.*, 1986*
PHA	rat	- réduction des activités trypsique, amylasique et hydrolasique du contenu de l'intestin grêle	Romanet *et al.*, 1983*
ConA	rat	- lectines se liéraient avec les groupes récepteurs de la surface des cellules de la muqueuse intestinale ou entraîneraient une mauvaise absorption des nutriments	Gallé, 1968* Lienet, 1986 Larue-Achagiotis *et al.*, 1992

Annexe 3B

Mode d'action de la lectine du haricot, PHA et de la Concanavaline A sur des animaux de laboratoire (rats principalement) - suite
(tableau non exhaustif)

ConA, WGA	rat, porc	- après injection dans une anse intestinale : perte cellulaire accélérée raccourcissement des villosités rupture de la bordure en brosse des entérocytes formation de vacuoles apicales et d'hétérophagosomes exfoliation des cellules de la muqueuse	Lorenzon et Olsen, 1982 King *et al.*, 1983
ConA	rat	- passage à travers la membrane plasmique de l'hépatocyte de rat	Roth, 1978*
ConA lectine soja PHA	rat	- inhibition *in vitro* de la entérokinase	Rouanet *et al.*, 1983
ConA	rat	- inhibition *in vitro* de la (Na^+, K^+)ATPase des membranes des hépatocytes	Luly et Emmelot, 1975
ConA	rat	- inhibition de la réponse adaptative de l'intestin à des variations de la composition du régime alimentaire (étude sur la sucrase, la phosphatase alcaline et la leucine aminopeptidase de la bordure en brosse des entérocytes) - les lectines sont elles-mêmes relativement résistantes à la digestion gastro-intestinale. La variabilité de cette résistance à la digestion pourrait expliquer les variations de toxicité d'une lectine à l'autre - action sur la paroi des cellules intestinales en modifiant l'absorption des nutriments	Pusztai *et al.*, 1985
ConA	rat	- provoque ou stimule une décharge de mucus par les cellules en gobelet et a un effet muco-attractif - hypersécrétion de mucus : réponse allergique de faible intensité dans l'intestin - lectines pouvant agir sur l'absorption des nutriments par la formation d'une barrière supplémentaire de mucus	Sjölander *et al.*, 1984 Hook *et al.*, 1974 Sjölander *et al.*, 1984
ConA, PHA	rat	- toxicité significativement réduite chez des rats "germ free" - induction d'une adhérence spécifique des califormes permettant leur prolifération, et élimination des autres souches bactériennes - la flore intestinale interagit avec la toxicité des lectines : un sur-développement bactérien accompagne fréquemment les destructions des microvillosités intestinales - rôle direct des agglutinines sur le transport des électrolytes : diarrhée - production par les rats consommant des régimes contenant une lectine, d'anticorps circulant du type IgG anti-lectine - diminution de l'efficacité du système local de production d'anticorps de type IgA	Raffray *et al.*, 1974* ; Jayne et Williams, 1973 ; Wilson *et al.*, 1980 ; Dobbins *et al.*, 1986 Greer et Pusztai, 1985 Pusztai *et al.*, 1981 Pusztai *et al.*, 1985 Wilson *et al.*, 1980 Banwell *et al.*, 1983

Annexe 4

Tableau brut des données sur lequel l'ACP de la figure 9 a été réalisée :

- lignes : les 27 lectines testées (+ ACA à titre indicatif)
- colonnes : les 12 variables permettant de décrire les effets de ces lectines :

  - mortalités aux jours 1, 3 ou 7 (d1, d3, d7) pour les concentrations a, b ou c (respectivement 10 $\mu g.ml^{-1}$, 50 $\mu g.ml^{-1}$, 250 $\mu g.ml^{-1}$).

  - inhibitions de croissance (IC) au jour d7 induites aux 3 concentrations.

1	Man/Glc													
2	Glc/GlCNAc													
3	GalNAc/Gal													
4	autres													
			Mortalité									IC d7		
			d1		d3			d7						
			md1a	md1b	md1c	md3a	md3b	md3c	md7a	md7b	md7c	ICa	ICb	ICc
1	VVAg	3	3	2	3	12	5	3	13	5	5	94	103	89
2	GSII	2	23	8	12	28	15	27	37	15	43	91	88	50
3	SBA	3	8	8	3	13	15	13	20	47	18	86	85	81
4	OPA	1	20	12	15	22	15	32	22	15	40	90	80	81
5	PHA	3	12	28	8	15	40	18	18	42	27	101	89	88
6	Jac	3	7	5	8	13	12	23	25	13	42	83	97	63
7	PNA	3	12	3	3	28	13	12	30	18	15	105	67	82
8	SJA	3	13	10	8	20	25	18	37	35	23	98	86	81
9	UEA	2	3	2	3	13	2	7	27	5	17	79	82	78
10	ECA	3	13	13	27	17	18	32	23	27	42	81	76	69
11	PSA	1	23	13	12	47	25	17	52	32	52	81	101	37
12	LcH	1	8	10	7	30	25	52	32	43	60	91	91	60
13	ConA	1	0	5	3	26	13	21	38	32	43	49	43	33
14	GNA	1	15	12	13	18	38	26	20	55	45	81	58	49
15	VVAn	1	0	0	0	0	0	0	18	12	8	115	110	93
16	VFA	1	0	0	0	0	0	0	13	7	12	81	121	103
17	SNA1	3	0	12	7	7	13	15	12	25	17	86	68	72
18	UDA	2	0	8	15	0	25	22	2	25	28	75	91	87
19	MAA	4	0	0	2	7	3	10	10	25	22	87	72	50
20	TL	3	2	2	0	17	7	2	30	12	3	59	83	56
21	PCA	3	0	0	0	0	3	0	12	12	15	99	89	99
22	LBA	3	0	0	0	0	2	5	3	8	15	97	92	90
23	TKA	3	2	0	2	3	0	2	5	3	8	97	92	84
24	BDA	3	0	0	0	0	0	3	10	12	18	101	97	112
25	CSA	3	0	2	2	2	3	2	10	12	8	83	87	85
26	RPA	4	15	0	0	28	0	0	30	2	10	101	85	83
27	SNA2	4	0	5	0	0	10	5	8	42	15	74	48	58
	ACA	3	0	2	43	0	2	92	8	10	100	100	86	0

Annexe 5

Notice d'utilisation du programme "Toxicologie™"

G. Febvay & Y. Rahbé, INSA-INRA 406, F-69621 Villeurbanne cedex
adresse internet : *febvay@inra.lyon.fr*

Introduction :

Le logiciel "Toxicologie™" réalise la transformation linéaire pondérée d'une courbe sigmoïde de mortalité (transformation des pourcentages de mortalité en probits). Ce programme calcule l'équation de la droite de régression et les doses (temps, ...) létales à différents niveaux de mortalité (50%, ...) avec leur intervalle de confiance. Il réalise le test d'adéquation à une relation linéaire (test du chi2) et le graphe de la droite de régression avec son intervalle de confiance.

Le calcul comprend 2 étapes : La première étape correspond à la transformation des pourcentages de mortalité en probits et le calcul d'une droite de régression prévisionnelle non pondérée et ne prenant pas en compte les observations avec 0 ou 100% de mortalité. Cette droite prévisionnelle permet le calcul des valeurs probits pour les observations avec 0 ou 100% de mortalité et, de la pondération à affecter à chaque point. La deuxième étape réalise alors le calcul de la droite de régression pondérée et de son intervalle de confiance. Les personnes intéressées par la théorie de cette méthode se reporteront à la publication de Bliss (1935)[1].

les données de mortalité à analyser doivent être enregistrées dans un fichier indépendamment du programme "Toxicologie™". Ceci est facilement réalisable à l'aide d'un tableur (Excel par exemple) en suivant les instructions ci-dessous.

Structure des fichiers :

Les données, stockées dans un fichier analysable par "Toxicologie™", comprennent pour chaque test (ou lot = ligne du fichier) la concentration en toxique (ou le temps de la mesure, ... = abscisses de la courbe), le nombre d'individus testés et le nombre de morts observés. Le calcul des pourcentages de mortalité est réalisé par le programme.

Si vous réalisez un test dose-mortalité, vous souhaiterez probablement réaliser la courbe de mortalité en fonction du logarithme de la concentration en toxique. Cette transformation pourra être réalisée automatiquement par le programme.

Si votre série de tests comporte un lot témoin et que vous souhaitez corriger les mortalités des différents lots selon le formule d'Abbott $\left(\%_{corrigé} = \frac{\%_{observé} - \%_{témoin}}{100 - \%_{témoin}}\right)$, vous devez entrer les données correspondant au témoin en première ligne du tableau de données. Le programme "Toxicologie™" peut réaliser cette correction et dans ce cas attribue automatiquement la première ligne du fichier au témoin.

Un fichier de données comprendra donc au minimum 3 colonnes et autant de lignes que de tests réalisés. Elles sont précédées par 4 premières lignes et 1 première colonne utilisées comme descripteurs. Il se présentera (dans sa forme la plus simple) comme ci-dessous.

---

[1] BLISS C.I., 1935. The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22, 134-167.

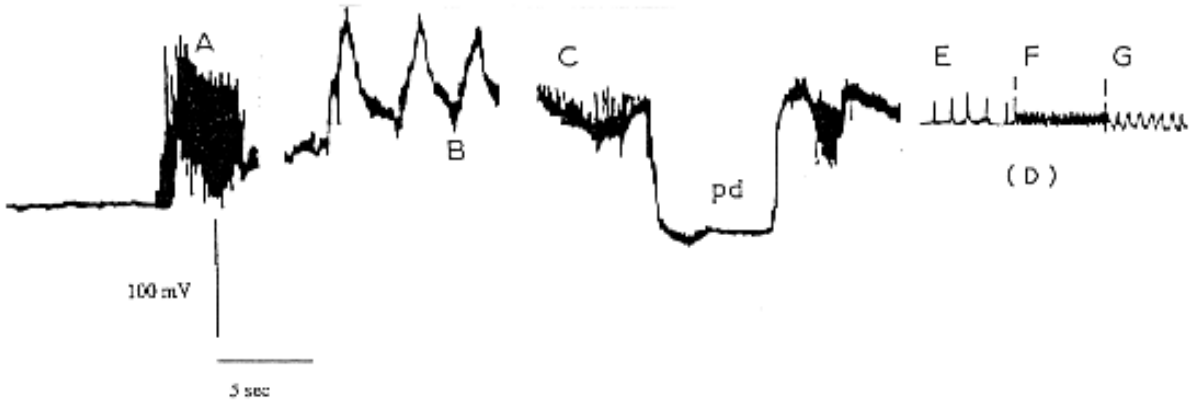
Annexe 6

Corrélation entre le type d'ondes enregistrées sur un graphe d'EPG et les activités de pénétration des stylets d'un puceron (Tjallingii, 1990 ; Van Helden, 1995)

Désignation[1]	Fréquence (en Hertz)	localisation[2]	corrélations : tissus du végétal	activité du puceron
A	5 à 10	e	épiderme	contact électrique des stylets
B	0,2 à 0,3	e	épiderme /mésophylle	salivation de la gaine
C	très variable	e	tout tissu	enfoncement des stylets
pd	0,02	i	toute cellule vivante	piqûre de l'extrémité des stylets
E1	2 à 4	i	tubes criblés - phloème	non déterminé
E1	2 à 4	e	non déterminé	non déterminé
E2 p	0,5 à 4	i	tubes criblés - phloème	salivation d'eau
w	4 à 7	i	tubes criblés - phloème	ingestion passive
F	11 à 18	e	tout tissu	travail mécanique des stylets
G	4 à 6	e	xylème	ingestion active

1 pour E2 : p = pic, w = grandes ondes
2 e = extracellulaire, i = intracellulaire

Représentation schématique des différents types d'ondes observables sur un EPG (Tjallingii, 1988)

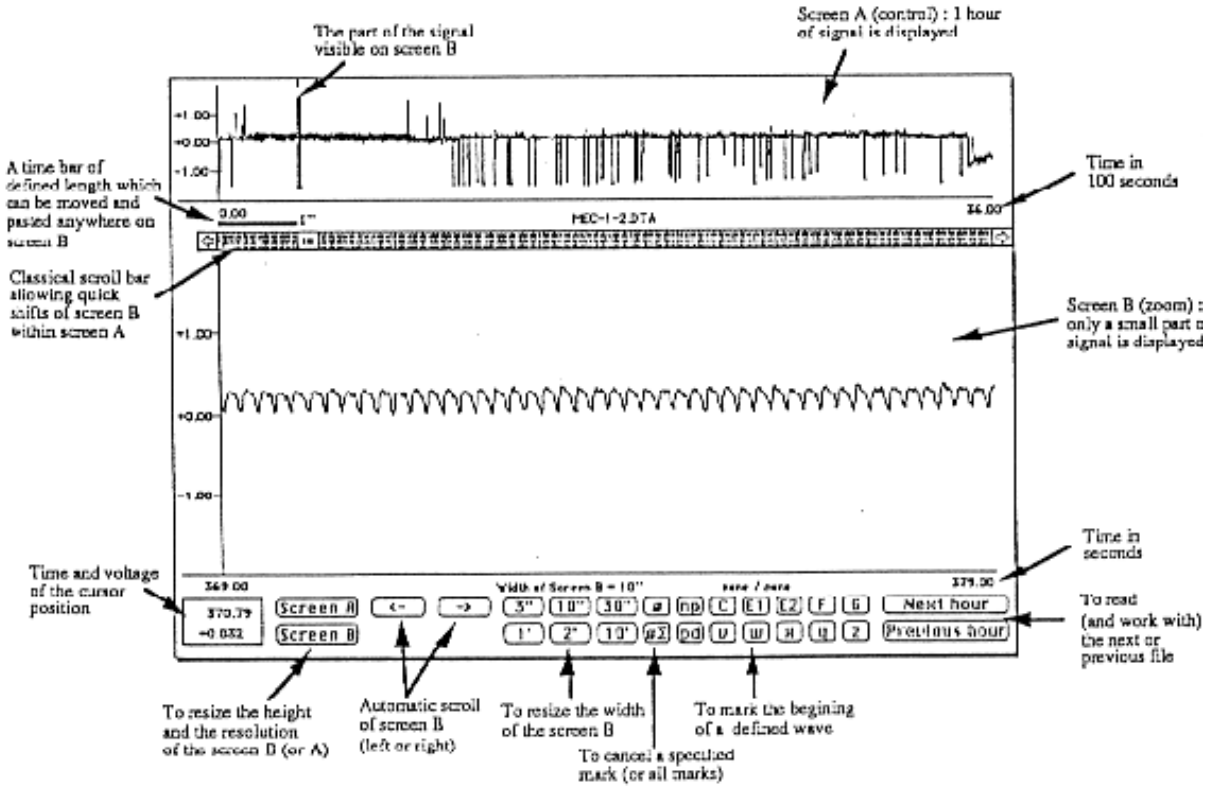


Annexe 7A

Fenêtre de travail du logiciel d'analyse des données EPG "MacStylet™"

G. Febvay & Y. Rahbé, INSA-INRA 406, F-69621 Villeurbanne cedex
adresse internet : *febvay@inra.lyon.fr*

The main window (working window) :


The part of the signal visible on screen B
Screen A (control) : 1 hour of signal is displayed
A time bar of defined length which can be moved and pasted anywhere on screen B
Time in 100 seconds
Classical scroll bar allowing quick shifts of screen B within screen A
Screen B (zoom) : only a small part o signal is displayed
Time in seconds
Time and voltage of the cursor position
To read (and work with) the next or previous file
Screen A
Screen B
Next hour
Previous hour
To resize the height and the resolution of the screen B (or A)
Automatic scroll of screen B (left or right)
To resize the width of the screen B
To cancel a specified mark (or all marks)
To mark the begining of a defined wave

Annexe 7B

Statistiques calculées par "MacStylet™"

Les statistiques calculées par MacStylet™ sont présentées en tableau, un premier tableau de statistiques générales et 3 tableaux qui analysent spécifiquement (en terme EPG) chaque pénétration du stylet.

Statistiques :

Statistics between 0 and 360000 (1/100s)

Marks	Nb	Σ Stay (1/100s)	% stay	Mean stay	Var stay
np	8	29528	8.23	3703	3977265
C	37	63115	17.54	1705	915184
E1	3	4433	1.23	1477	32801
E2	2	232128	64.5	116064	1.191055E+08
F	0	0	0	0	---
G	3	17447	4.84	5815	1089472
pd	28	13088	3.63	467	4585
u	0	0	0	0	---
w	0	0	0	0	---
x	0	0	0	0	---
y	0	0	0	0	---
z	0	0	0	0	---
Total	91	359840			

General statistics

Successive penetrations (time param. for phase accept. >= 0 sin)

No P	Start time	Suc	Phi	P>x	*E1	*E2	*E>x	*G	*inE
1	160	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7225	0	0	0	0	0	0	0	0
3	14708	1	0	0	0	0	0	1	0
4	27740	0	0	0	0	0	0	0	0
5	44183	1	0	0	0	0	0	1	0
6	56533	1	1	0	1	0	0	0	1
7	77116	1	0	0	0	0	0	1	0
8	93576	1	1	1	1	1	1	0	1
9	226588	1	1	1	1	1	1	0	1
Total		6	3	2	3	2	2	3	3

Analysis of each penetration

Time to each first mark since beginning of penetration

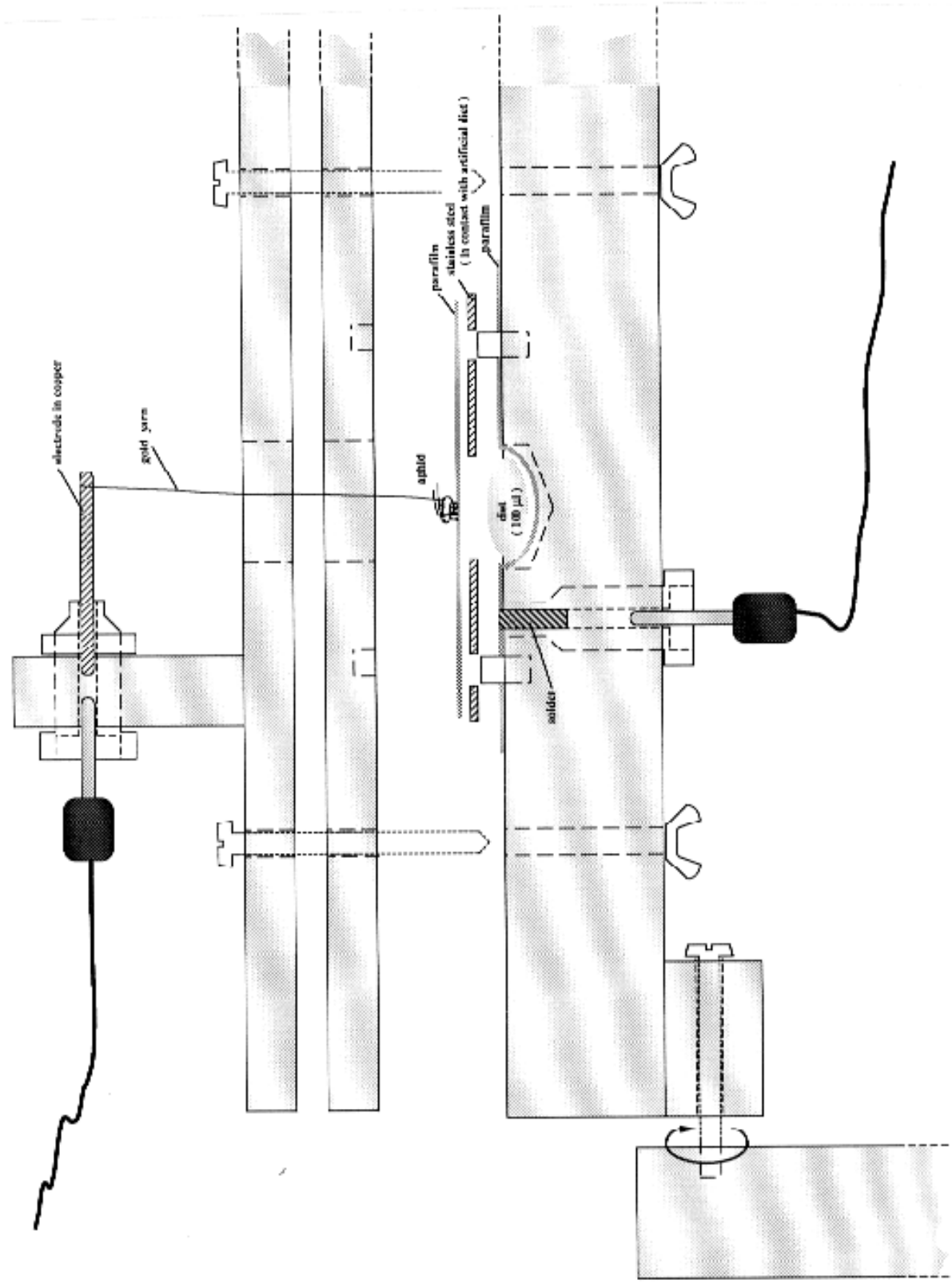
No P	E1	E2	E>x	G
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	6857
4	0	0	0	0
5	0	0	0	2817
6	14622	0	0	0
7	0	0	0	3043
8	13872	15527	13872	0
9	8145	9631	8145	0

Cumulative stay for each mark in successive penetrations

No P	E1	E2	E>x	G
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	4592
4	0	0	0	0
5	0	0	0	4755
6	1293	0	0	0
7	0	0	0	6000
8	1903	108347	110002	0
9	1485	123781	125256	0
Total	4433	232128	235258	17447

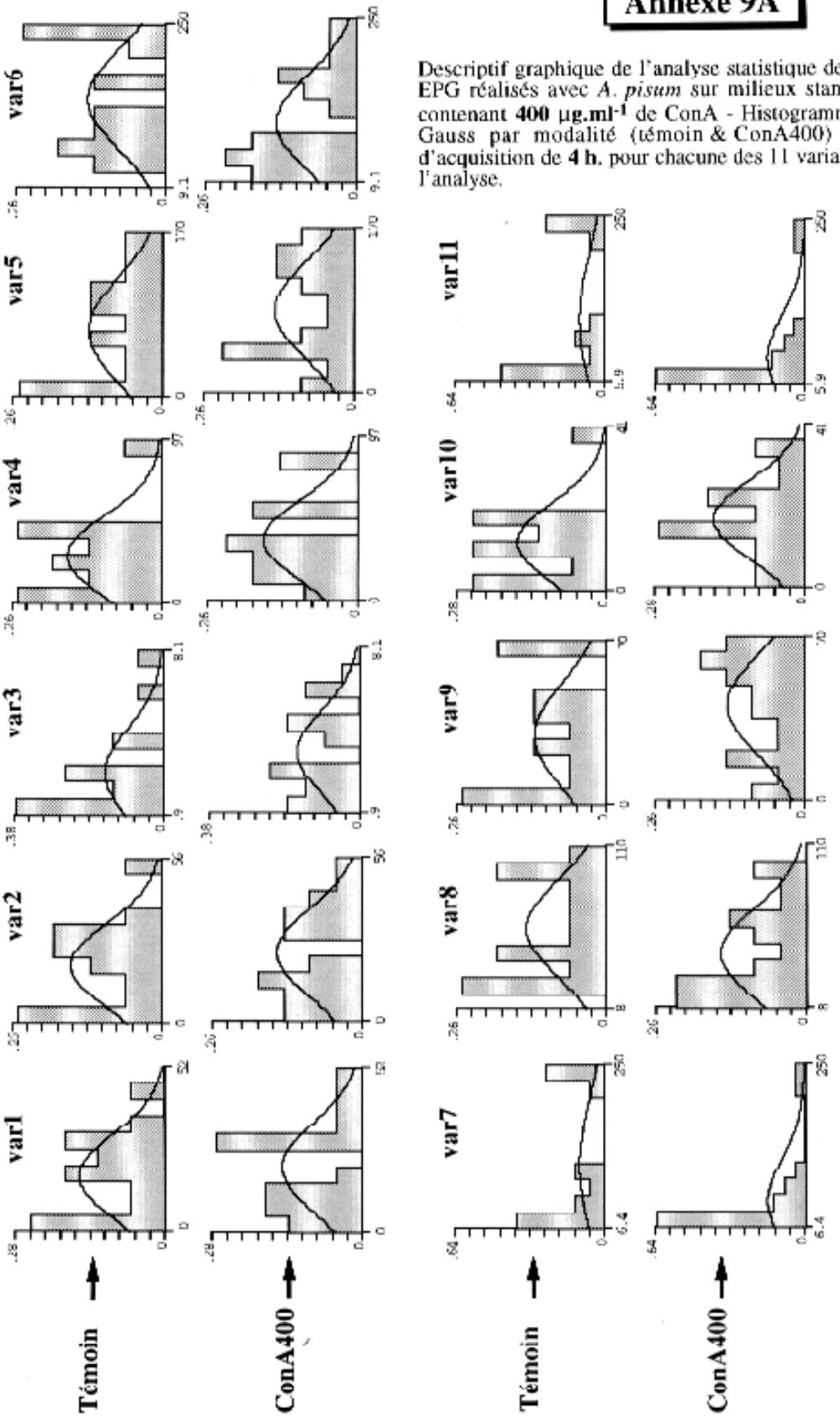
Annexe 8

Descriptif graphique du dispositif élaboré pour enregistrer le comportement d'alimentation des pucerons sur milieu artificiel.



Annexe 9A

Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec *A. pisum* sur milieux standards simples ou contenant **400 µg.ml^{-1}** de ConA - Histogrammes et courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA400) pour une durée d'acquisition de **4 h.** pour chacune des 11 variables retenues dans l'analyse.



ConA 400 - 4h

Annexe 9B

Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec *A. pisum* sur milieux standards simples ou contenant **400** $\mu g.ml^{-1}$ de ConA Histogrammes et courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA400) pour une durée d'acquisition de **8 h**, pour chacune des 11 variables retenues dans l'analyse.

ConA 400 - 8h

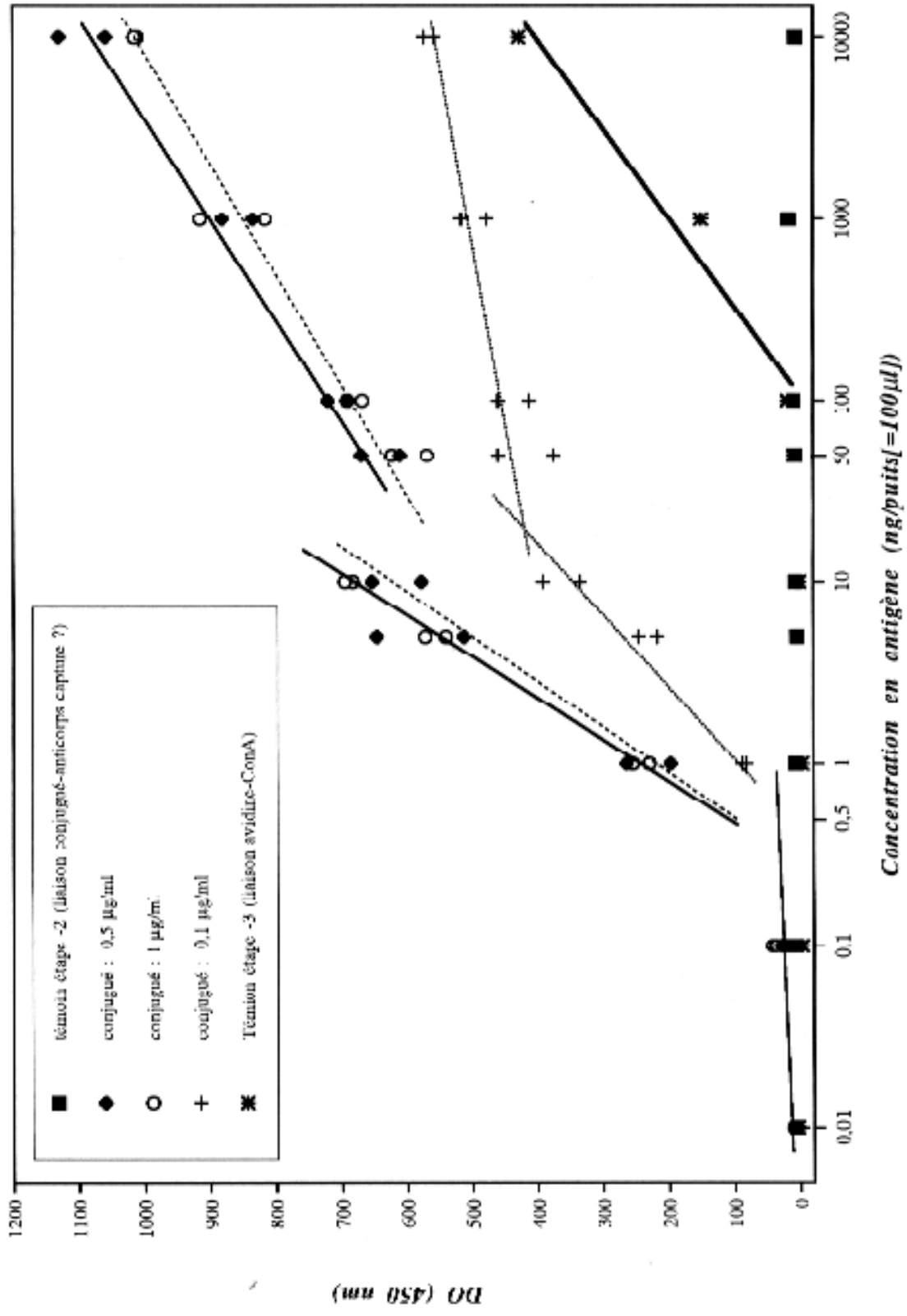
Annexe 9C

Descriptif graphique de l'analyse statistique des enregistrements EPG réalisés avec *A. pisum* sur milieux standards simples ou contenant **400 µg.ml^{-1}** de ConA - Histogrammes et courbes de Gauss par modalité (témoin & ConA400) pour une durée d'acquisition de **24 h**, pour chacune des 11 variables retenues dans l'analyse.

ConA 400 - 24h

Annexe 10

Résultats de dosages ELISA réalisés sur une gamme de Concanavaline A (0,01 à 10000 ng/puits) avec 3 concentrations différentes de conjugué (anti-ConA secondaire biotinylé) - La procédure suivie est décrite dans les fiches-protocole N°9A & 9B.



Annexe 11

Représentation schématique de tubes digestifs de différentes espèces aphidiennes (Ponsen, 1987).

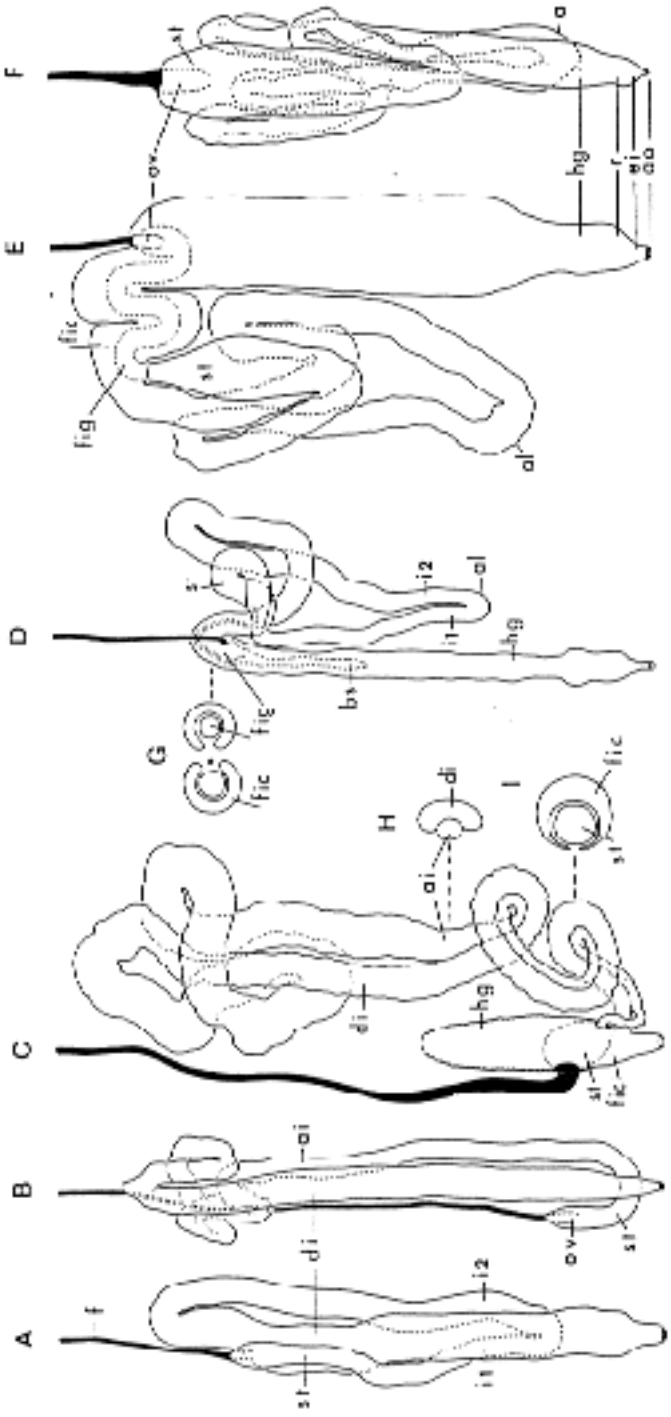


Fig. 2.1.6. Semi-schematic representation of the digestive system of (A) *Thelaxes dryophila* (Schrank); (E) *Drepanosiphum aceris* Koch; (C) *Subsalltusaphis ornata* Theobald; (D) *Eulachnus brevipilosus* Börner; (E) *Cryptomyzus ribis* Linnaeus; and (F) *Myzus persicae* (Sulzer). Transverse sections of the concentric filtersystem of (G) *E. brevipilosus*; (H) the parallel filtersystem; and (I) the concentric filtersystem of *S. ornata* (Ponsen, 1977, 1979, 1981, 1982a). For list of abbreviations see p. 37.

AAL Pucerons entiers - Données brutes (nmol/mg d'échantillon)

Acide aminé	Probabilité (P%) Test Kruskal-Wallis (2) ConA	GNA	ConA/GNA	T moyenne n = 4	ConA200 moyenne n = 5	% / témoin	ConA400 moyenne n = 5	% / témoin	ConA800 moyenne n = 5	% / témoin	GNA5 moyenne n = 5	% / témoin	GNA20 moyenne n = 4	% / témoin	GNA400 moyenne n = 4	% / témoin
Acide aspartique	0,64	61	2,5	1,05	0,88	-15,84	1,25	19,46	1,99	90,10	0,95	-9,22	0,75	-28,06	0,64	-38,46
Thréonine	1,68	26	37,9	5,23	3,73	-28,66	3,75	-28,34	5,27	0,83	3,81	-26,64	4,06	-22,34	4,13	-21,03
Sérine	2,07	7,3	51,8	4,41	3,60	-18,41	4,00	-9,22	6,02	36,52	3,24	-26,45	3,54	-19,76	3,85	-12,35
Asparagine	0,25	10,1	0,4	11,65	6,18	-46,97	5,86	-49,67	18,95	62,74	7,71	-33,77	7,94	-31,80	8,20	-29,58
Acide glutamique	0,35	1,8	2,5	13,19	7,51	-43,06	7,43	-43,71	12,85	-2,62	9,17	-30,48	9,05	-31,39	7,70	-41,60
Glutamine	0,1	2,3	0,1	9,12	3,18	-65,15	1,96	-78,58	6,87	-24,59	3,76	-58,80	4,67	-48,80	4,95	-45,68
Proline	0,18	3,9	0,13	9,18	4,01	-56,29	3,12	-65,99	4,46	-51,40	5,68	-38,07	5,77	-37,16	5,43	-40,29
Glycine	0,45	13,4	1,12	8,65	5,14	-40,56	4,63	-46,06	6,99	-19,21	5,09	-41,21	6,16	-28,74	6,55	-24,32
Alanine	0,21	1,8	1,1	21,87	12,65	-42,14	10,79	-50,67	16,87	-22,86	13,31	-39,14	15,34	-29,84	13,40	-38,75
Valine	3,01	8,3	2,6	5,42	3,84	-29,13	3,67	-32,38	4,33	-20,13	3,34	-38,35	4,02	-25,92	4,65	-14,38
Méthionine	0,37	42,3	12,9	1,74	1,31	-24,80	1,30	-25,17	3,27	87,76	1,39	-20,20	1,56	-10,26	1,45	-16,58
Isoleucine	0,75	7,6	17,8	2,89	2,36	-18,18	2,40	-16,82	3,82	32,21	1,81	-37,32	2,21	-23,31	2,25	-22,19
Leucine	0,27	1,7	1,5	4,07	3,81	-6,22	3,49	-14,10	5,79	42,50	2,59	-36,43	3,13	-22,96	3,18	-22,23
Tyrosine	1,44	4,4	2,7	7,09	4,26	-39,95	2,53	-63,59	3,82	-46,22	3,57	-49,71	4,20	-40,81	6,22	-12,30
Phénylalanine	0,42	1,5	0,9	3,37	1,95	-41,96	1,68	-50,23	2,19	-34,95	2,09	-37,80	2,43	-27,76	1,91	-43,17
B Ala-Tyr (1)	23,35	74,9	31,2	2,81	1,22	-56,79	0,89	-68,51	1,82	-35,24	1,79	-36,46	1,61	-42,81	1,99	-29,12
Ornithine	2,32	0,8	2,1	0,38	0,21	-45,64	0,29	-23,31	0,52	37,61	0,15	-59,44	0,22	-42,18	0,11	-71,42
Lysine	0,28	4,7	0,7	8,75	4,73	-45,99	3,92	-55,22	7,17	-18,09	5,04	-42,35	5,81	-33,60	4,63	-46,53
Histidine	0,27	0,6	0,3	3,84	2,53	-34,04	2,89	-24,74	4,69	22,10	2,63	-31,38	1,77	-53,81	1,83	-52,35
Arginine	0,14	7,7	0,3	4,13	4,49	8,53	7,33	78,51	13,49	226,13	3,05	-26,13	2,76	-33,23	3,11	-24,80
Totaux	0,3	5,1	2	135,23	82,57	-38,94	78,15	-42,21	135,91	0,51	84,18	-37,77	91,11	-32,63	90,15	-33,34
± SE				16,52	4,10		2,49		12,45		9,67		0,83		4,22	

(1) non pris en compte dans l'AFC. Acide aminé constituant des milieux, permettant d'apporter de la tyrosine sous forme soluble

(2) test non-parmétrique de comparaisons des moyennes se rapportant aux modalités :

témoin/ConA200/ConA400/ConA800 = "ConA"

témoin/GNA5/GNA20/GNA400 = "GNA"

témoin/ConA200/ConA400/GNA400 = "ConA/GNA"

Annexe 12A

AAL Pucerons entiers - Données relatives

Acide aminé	Probabilité (P%) Test Kruskall-Wallis ConA	GNA	ConA/GNA	T moyenne n = 4	ConA200 moyenne n = 5	% / témoin	ConA400 moyenne n = 5	% / témoin	ConA800 moyenne n = 5	% / témoin	GNA5 moyenne n = 5	% / témoin	GNA20 moyenne n = 4	% / témoin	GNA400 moyenne n = 4	% / témoin
Acide aspartique	0,25	40,5	0,57	0,73	1,08	47,76	1,60	119,98	1,47	101,30	1,23	68,45	0,83	13,31	0,73	0,14
Thréonine	0,51	3,2	1,8	3,86	4,50	16,65	4,79	24,05	3,91	1,39	4,62	19,63	4,46	15,53	4,60	19,20
Sérine	0,3	1,3	0,4	3,27	4,34	32,73	5,12	56,74	4,46	36,61	3,87	18,35	3,88	18,88	4,30	31,80
Asparagine	0,3	16,84	0,6	8,59	7,48	-12,88	7,49	-12,93	13,47	56,76	9,22	7,32	8,72	1,53	9,10	5,92
Acide glutamique	68	14,21	15,8	9,69	9,15	-5,64	9,52	-1,76	9,47	-2,32	11,22	15,74	9,93	2,46	8,53	-11,45
Glutamine	0,1	1,8	0,1	6,68	3,83	-42,61	2,53	-62,58	4,98	-25,43	4,34	-34,96	5,13	-23,21	5,45	-18,19
Proline	0,1	4,1	0,1	6,86	4,85	-29,22	4,00	-41,70	3,32	-51,61	6,78	-1,42	6,33	-7,73	6,03	-11,36
Glycine	0,7	2,29	1,1	6,40	6,20	-3,09	5,97	-6,68	5,18	-15,14	5,93	-7,30	5,77	5,77	7,23	12,91
Alanine	0,4	41,8	5,9	16,42	15,27	-6,99	13,79	-16,04	12,48	-23,98	15,44	-5,97	16,85	2,66	14,81	-9,78
Valine	0,2	1,6	0,57	4,04	4,65	15,08	4,63	16,26	3,23	-15,94	3,97	-1,66	4,41	5,25	5,14	27,29
Méthionine	0,9	48,9	46,9	1,34	1,62	20,46	1,67	24,19	2,41	79,96	1,69	25,98	1,71	27,86	1,61	19,98
Isoleucine	2,2	33	0,8	2,17	2,88	32,32	3,07	41,27	2,85	31,03	2,15	-0,70	2,43	11,73	2,48	13,96
Leucine	3,7	27,6	6,5	3,13	4,63	47,77	4,47	42,70	4,35	38,83	3,09	-1,77	3,44	9,64	3,49	11,37
Tyrosine	0,6	5,1	1,7	5,19	5,19	0,05	3,23	-36,56	2,84	-45,29	3,95	-23,78	4,62	-10,97	6,85	32,25
Phénylalanine	0,3	2,3	1,2	2,53	2,38	-5,95	2,14	-15,20	1,61	-36,27	2,51	-0,57	2,67	5,55	2,11	-16,45
B Ala Tyr (1)	67	61,9	42,3	1,81	1,46	-19,43	1,14	-36,96	1,40	-22,44	1,93	6,95	1,77	-2,14	2,31	27,92
Ornithine	20,3	4,4	1,7	0,27	0,24	-13,98	0,39	37,05	0,40	44,56	0,20	-27,50	0,24	-12,54	0,12	-56,34
Lysine	0,6	16,6	0,6	6,44	5,70	-11,49	5,01	-22,24	5,21	-15,13	5,94	-7,77	6,38	-0,94	5,19	-19,40
Histidine	0,2	0,9	0,2	2,82	3,07	8,76	3,71	31,33	3,45	22,26	3,20	13,25	1,94	-31,27	2,04	-27,86
Arginine	0,2	38,7	0,2	3,14	5,41	72,35	9,47	201,59	9,97	217,44	3,85	22,92	3,02	-3,98	3,45	10,19
Totaux				100,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00

(1) non pris en compte dans l'AFC. Acide aminé constituant des milieux permettant d'apporter de la tyrosine sous forme soluble.

(2) test non-paramétrique de comparaisons des moyennes se rapportant aux modalités :

témoin/ConA200/ConA400/ConA800 = "ConA"

témoin/GNA5/GNA20/GNA400 = "GNA"

témoin/ConA200/ConA400/GNA100 = "ConA/GNA"

Annexe 12B

AAL Miellat - Données relatives

Acide aminé	Probabilité (%) test Kruskal-Wallis (1)			Témoin moyenne n = 4	ConA200 moyenne n = 5	%/témoin	ConA400 moyenne n = 4	%/témoin	ConA800 moyenne n = 4	%/témoin	GNA5 moyenne n = 4	%/témoin	GNA20 moyenne n = 4	%/témoin	GNA400 moyenne n = 3	%/témoin
	ConA	GNA	ConA/GNA													
Acide aspartique	1,1	55,9	20,7	0,67	0,9	35,21	1,17	73,90	2,67	295,10	0,53	-21,26	0,56	16,65	0,63	-6,64
Thréonine	0,8	14,9	0,4	3,81	1,36	-64,20	1,08	-71,62	1,48	-61,14	3,24	-14,98	2,71	-28,99	3,40	-10,75
Sérine	0,4	17,8	0,5	3,17	1,22	61,50	1,53	51,68	2,96	-5,65	2,26	28,51	1,97	-37,72	2,52	-20,56
Asparagine	7,6	78,8	76,9	1,32	4,64	250,79	13,69	934,38	27,89	2005,46	2,22	67,33	1,75	31,94	2,20	66,31
Acide glutamique	2,3	81,9	50,6	0,28	0,43	56,88	0,62	124,22	1,99	623,17	0,34	23,68	0,34	23,71	0,40	46,01
Glutamine	4,7	21,8	17,4	0,30	0,52	75,41	0,45	53,74	2,12	615,01	0,65	119,69	0,52	74,70	0,53	80,03
Proline	2,5	14,1	0,6	2,24	0,26	-88,39	0,10	-95,53	0,34	-85,01	1,80	-19,68	1,45	-35,13	1,63	-27,26
Glycine	0,4	1,92	0,6	6,83	1,66	-75,74	1,42	-79,15	3,10	-54,64	5,29	-22,59	3,86	-43,47	3,43	-49,71
Alanine	0,4	3,4	0,3	0,93	0,2	77,22	0,32	-65,78	0,72	-22,54	0,55	-41,45	0,45	51,82	0,59	-36,40
Citrulline (2)			0,5	0,00	0,18		0,39		0,69		0,00		0,01		0,00	
Valine	0,3	8,7	0,3	4,19	0,35	-91,77	0,02	-99,63	0,02	-99,56	3,04	-27,51	2,15	-48,80	2,47	41,08
X = "Cystine" (3)	64,5	5,9	0,5	0,09	0,43	397,00	0,24	181,48	0,66	660,09	0,06	-25,67	0,08	-5,25	0,11	27,64
Méthionine	1,9	3,4	0,6	0,86	0,72	-16,58	0,02	-98,15	1,71	98,26	0,72	-15,91	0,47	-45,37	0,40	-52,98
Isoleucine	0,4	17,5	0,4	3,10	0,13	-95,69	0,00	-99,87	0,03	-99,18	2,55	-17,82	1,92	-38,10	2,74	-11,69
Leucine	0,4	2,8	0,4	9,37	3,28	-65,03	1,04	-88,87	1,10	-88,26	9,39	0,22	6,93	-26,00	4,65	-50,39
Tyrosine	2,5	7,4	1,1	0,62	0,24	61,10	0,19	-69,47	0,13	-78,90	0,67	8,36	0,53	14,19	0,38	-38,71
Phénylalanine	1,2	11,6	0,4	5,89	1,67	-71,57	0,78	-86,68	2,14	63,65	6,71	14,06	5,79	-1,62	3,02	-48,69
Y = "B Ala Tyr" (4)	0,9	1,4	3,3	7,79	10,76	38,11	9,75	25,09	0,00	-100,00	9,09	16,65	9,70	24,55	12,36	58,64
Tryptophane (5)	3,4	14,1	1	0,82							1,00	22,41	0,72	-12,23	0,21	-74,49
Ornithine	1,1	70	0,9	1,26	0,87	-31,01	0,79	-37,76	1,83	44,91	1,17	-7,61	1,22	-3,60	1,22	-3,29
Lysine	0,3	29,1	0,6	16,05	6,53	59,30	2,21	86,22	3,90	75,68	16,57	3,28	17,94	11,81	14,17	-11,69
Histidine	2,3	0,6	3,9	4,08	8,5	108,84	7,39	81,21	5,46	33,96	5,23	28,33	7,04	72,66	8,28	103,19
Arginine	1,9	14,2	1,19	25,71	54,5	111,99	56,73	120,63	38,88	51,22	26,19	1,81	31,11	20,99	34,49	34,14

(1) est non-paramétrique de comparaisons des moyennes se rapportant aux modalités :
témoin/ConA200/ConA400/ConA800 = "ConA"
témoin/GNA5/GNA20/GNA400 = "GNA"
témoin/ConA200/ConA400/GNA400 = "ConA/GNA"

(2) non pris en compte dans l'AFC. Acide aminé (confirmé comme étant de la citrulline sur la base des rapports de coloration sur les deux canaux de l'autoanalyseur) trouvé uniquement dans les extraits des modalités ConA

(3) le pic X ne correspond vraisemblablement pas à la cystine (rapport de coloration non conforme)

(4) 'pic" dont le temps de rétention correspond à celui de la B-alanine-tyrosine mais :
Y = composante de 3 pics pour les témoins
Y = composante de 2 pics pour ConA200 & ConA400 (ConA800 ?)
Y = 1 pic pour GNA

(5) non pris en compte dans l'AFC. Acide aminé (confirmé comme étant du tryptophane sur la base des rapports de coloration sur les deux canaux de l'autoanalyseur) non mesurable dans les extraits des modalités ConA

Annexe 12C

Annexe 13

Abréviations utilisées dans les figures 44, 45 et 54 (Ponsen, 1972 & 1987)

ABBREVIATIONS USED IN FIGURES

a	antenna
ag	abdominal ganglion
ai	ascending intestine
al	abdominal loop
ao	anal opening
asd	afferent salivary duct
asg	accessory salivary gland
bmc	basophilic mesodermal cell
bs	bloodsack
ca	corpus allatum
cb	central body
cc	corpus cardiacum
ce	compound eye
cl	clypeus
clb	clypeo-labrum
co	cornicle = siphunculi
ccc	circumoesophageal connective
cry	crystal
csd	common salivary duct
cu	cuticle
d	ductocerebrum
dgc	dermal gland cell
di	descending intestine
dl	dorsal lobe
dv	dorsal vessel
dz	Deckzell
eb	eosinophilic body
ego	epipharyngeal gustatory organ
ei	epidermal invagination
emc	embryonic mesodermal cell
ep	epidermis
epc	epidermal cell
epi	epicranium
esd	efferent salivary duct
et	eye-tubercle (triommatidion)
f	foregut
fac	fat cell
fc	food canal
fic	filterchamber
fig	filtergut
go	gonopore
h	Hauptzell
hg	hindgut
hpgo	hypopharyngeal gustatory organ
hpl	hypopharynx lip
i	intestine
i 1	first part of intestine
i 2	second part of intestine
ic	intracellular canaliculum
in	intima
isc	intercellular secretory canaliculum
la	labium
lb	labrum
mbr	"membranes"
mc	myoepithelioid cell
msg	mesothoracic ganglion
mtg	metathoracic ganglion
my	mycetome
myc	mycetocyte
M 2	circular muscle fibres
M 4	divaricator muscle
M 17	retractor muscle of salivary pump piston
M 20	retractor muscle of afferent salivary duct opening
M 21	ventral pharyngeal pump muscle
n	nucleus
nu	nucleolus
N 2	branch of medial dorsal nerve
N 5	dorsal lobe nerve to corpus cardiacum
N 10	main abdominal nerve
N 13	medial dorsal nerve
N 14	nerve to cornicle muscles
N 15	nerve to divaricator muscles 4 and 5
N 24	pharyngeal nerve
o	ostium
oen	oenocyte
olc	outer layer of cuticule
ov	oesophageal valve
p	protocerebrum
pb	proboscis
pcc	pericardial cell
pg	prothoracic ganglion
phd	pharyngeal duct
phg	pharyngeal ganglion
php	pharyngeal pump
ps	pumpstem
psg	principal salivary gland
pt	piston
r	rectum
sa	salivary canal
sdc	salivary duct cell
sep	sensillum pore
sog	suboesophageal ganglion
st	stomach
s	sutucerebrum
tb	tentorial bar
te	tendon
tgc	thoracic gland cell
tp	tunica propria
tpc	triplet cell
va	vacuole
vci	voluminous coil of intestine
w	waxy droplet